

Aus der Klinik III für Innere Medizin  
der Universitätsklinik des Saarlandes in Homburg  
Direktor: Professor Dr. med. Michael Böhm  
Betreuung: Professor Dr. med. Ulrich Laufs

**Regulation der Endothelfunktion durch lipidsenkende  
Medikamente und Inhibitoren des  
Renin-Angiotensin-Systems**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes in Homburg  
2009

vorgelegt von

Mathias Fritz

12.01.1976 Neunkirchen/Saar

## **Nomenklatur**

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden zwei Studien durchgeführt. Gegenstand der Untersuchungen war bei beiden Studien die Endothelfunktion. Der eigentlichen Hauptstudie mit Vergleich von AT1-Rezeptor-Antagonist Telmisartan und ACE-Hemmer Ramipril ging eine kleinere Studie zum Erlernen der sonographischen Fähigkeiten voraus. Hierbei wurde der HMG CoA-Inhibitor Atorvastatin mit dem Cholesterinaufnahmehemmer Ezetimib verglichen. Im Folgenden werden diese beiden Studien zur besseren Transparenz getrennt behandelt. Die Studien werden als „RAAS-Studie“ und „Lipidstudie“ benannt.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>5</b>
1.1	Lipidstudie	5
1.2	RAAS-Studie	6
<b>1.3</b>	<b>Summary</b>	<b>8</b>
1.3.1	Lipid-Study	8
1.3.2	RAAS-Study	9
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>11</b>
2.1	Koronare Herzkrankheit als Folge der Atherosklerose	11
2.2	Bedeutung der Endothelialen Progenitorzellen für die Homöostase und Funktion des Endothels	13
2.3	Physiologie des Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)	16
2.4	Bedeutung der Endotelialen Dysfunktion in der Pathogenese der Atherosklerose	19
2.5	Bedeutung von Cholesterinsynthesehemmern und Cholesterinaufnahmehemmern bei der Pathogenese der Atherosklerose	21
2.6	Fragestellung	24
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>25</b>
<b>3.1</b>	<b>Methoden</b>	<b>25</b>
3.1.1	Design Lipidstudie	25
3.1.1.1	Messung der Lipide und Sterole	25
3.2.1	Messung der Endothelfunktion	26
3.2.1.1	Messung der endothelabhängigen Vasodilatation	26
3.2.1.2	Messung der endothelunabhängigen Vasodilatation	28

3.2.1.3	Analyse der Messdaten Design	28
3.3.1	RAAS-Studie	30
3.3.2	Isolation zirkulierender humaner EPC Subpopulationen	31
3.3.3	Durchflusszytometrie/FACS	31
3.3.3.1	Prinzip der Durchflusszytometrie/FACS	31
3.3.3.2	Analyse der EPC-Populationen mittels Durchflusszytometrie	34
3.3.4	Colony forming units (CFU)	35
3.4	Statistische Analyse	37
<b>3.5</b>	<b>Materialien</b>	<b>37</b>
3.5.1	Verwendete Substanzen	37
3.5.2	Verwendete Puffer	38
3.5.3	Antikörper für FACS-Analyse	39
3.5.4	Weitere Antikörper	40
3.5.5	Weiter Materialien	40
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>41</b>
<b>4.1</b>	<b>Lipidstudie</b>	<b>41</b>
4.1.1	Wirkung von Atorvastatin 80 mg und Ezetimib 10 mg und Atorvastatin 10 mg + Ezetimib 10 mg auf die Cholesterinabsorption, Synthese und Plasmacholesterinkonzentration	42
4.1.2	Differentieller Einfluss von Atorvastatin 80 mg und Ezetimib 10 mg und Atorvastatin 10 mg + Ezetimib 10 mg auf den hyperämie-induzierten Blutfluss im Unterarm	44
4.1.3	hsCRP unter der Behandlung mit Atorvastatin 80 mg und Ezetimib 10 mg und Atorvastatin 10 mg + Ezetimib 10 mg	45
<b>4.2</b>	<b>RAAS-Studie</b>	<b>46</b>
4.2.1	Effekte von Ramipril 10 mg und Telmisartan 80 mg auf den systolischen Blutdruck	47
4.2.2	Differentieller Einfluss von Ramipril 10 mg und Telmisartan 80 mg auf den hyperämie-induzierten Blutfluss im Unterarm	48

4.2.3	Differentielle Regulation der Anzahl der zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen durch Ramipril 10 mg und Telmisartan 80 mg	49
4.2.4	Regulation der colony forming units durch Behandlung mit Ramipril 10 mg und Telmisartan 80 mg Ramipril und Telmisartan	50
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>51</b>
<b>5.1</b>	<b>Lipidstudie</b>	<b>51</b>
<b>5.2</b>	<b>RAAS-Studie</b>	<b>54</b>
5.2.1	Klinische Bedeutung der Studie	58
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>59</b>
<b>7</b>	<b>Danksagung</b>	<b>68</b>
<b>8</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>69</b>

# 1. Zusammenfassung

## 1.1 Lipidstudie

Eine Behandlung mit Statinen reduziert oxidativen Stress, vaskuläre Inflammation und verbessert die Gefäßfunktion. Ob direkte vaskuläre, lipidunabhängige Effekte der Statine dabei beteiligt sind bleibt umstritten.

In einer doppelblinden, dreiarmligen, Crossoverstudie wurden sechs gesunde Probanden für jeweils 7 Tage mit entweder 80 mg/d Atorvastatin oder mit 10 mg/d des Cholesterinaufnahmehemmers Ezetimib oder mit der Kombination von Atorvastatin 10 mg/d und Ezetimib 10 mg/d behandelt. Dabei reduzierte Atorvastatin 80 mg/d das LDL-Cholesterin um 41,5%, Ezetimib 10 mg/d um 11,8% und die Kombinationsbehandlung um 47,7%. Die Cholesterinbiosynthese (gemessen als Verhältnis von Lathosterin zu Cholesterin) wurde durch Atorvastatin um 73% und von der Kombination um 25% gesenkt. Sie stieg um 54% bei der Behandlung mit Ezetimib an. Die Cholesterinabsorption (gemessen als Plasmakonzentration von Campesterin und Sitosterin) wurde durch Ezetimib und durch die Kombination reduziert, blieb jedoch bei der Atorvastatin Monotherapie unverändert. Die endothelabhängige Vasodilatation der A. brachialis wurde nur durch die Behandlung mit der Statin Hochdosistherapie verbessert ( $+3,6 \pm 3,4\%$ ). Ezetimib verschlechterte die Endothelfunktion ( $-5,8 \pm 0,9\%$ ,  $p < 0.05$ ), während die Kombinationstherapie aus Atorvastatin und Ezetimib keinen Effekt hatte ( $+1,4 \pm 3,4\%$ ).

Bei gleicher Senkung des Cholesterins durch eine Hochdosistherapie mit Atorvastatin und Kombination aus einer Niedrigdosistherapie mit Atorvastatin und Ezetimib, zeigt sich nur unter der Atorvastatin Monotherapie eine Verbesserung der Endothelfunktion. Diese Erkenntnisse unterstützen die These, dass die Statinbehandlung zusätzlich zu der Lipidsenkung, cholesterinunabhängige, protektive Effekte besitzen könnte.

## 1.2 RAAS-Studie

Die Atherosklerose ist die Ursache von koronarer Herzkrankheit, Schlaganfall und peripherer arterieller Verschlusskrankheit. Diese Erkrankungen sind die wichtigsten Todesursachen in den westlichen Industrienationen. Die verminderte Regeneration des Endothels mittels ehemals knochenmarkständiger endothelialer Progenitorzellen und die beschleunigten Inflammationsvorgänge in der Gefäßwand, sowie die Endothelzellapoptose führen zu endothelialer Dysfunktion und somit zu Atherosklerose. Folge ist eine erhöhte Rate von kardiovaskulären Ereignissen. Endotheliale Dysfunktion bedeutet, dass die endothelabhängige, NO-vermittelte Vasodilatation vermindert ist. Dies geht mit proinflammatorischen Prozessen in der Gefäßwand einher und repräsentiert ein frühes Stadium der Atherosklerose. Endotheliale Progenitorzellen (EPC) aus dem Knochenmark spielen eine wichtige Rolle im Rahmen von endothelialen Reparaturmechanismen und der Neoangiogenese. EPC fördern die endotheliale Regeneration und verbessern die Endothelfunktion. Die Regulation der EPC durch Angiotensinrezeptorblocker ist unbekannt.

In diese Studie wurden 36 Probanden mit stabiler koronarer Herzerkrankung eingeschlossen. Die Patienten wurden doppelblind und prospektiv in drei Behandlungsarme randomisiert: AT1-Antagonist Telmisartan 80 mg/d, ACE-Hemmer Ramipril 10 mg/d oder Placebo. Die Gabe der Studienmedikation erfolgte für 3 Monate zusätzlich zu einer leitliniengerechten medikamentösen Behandlung der KHK, die während der Studiendauer nicht modifiziert wurde.

Zur Messung des Einfluss auf die endotheliale Dysfunktion wurde eine ultraschallbasierte Blutflussmessung der A. brachialis vor und nach der Behandlungsphase durchgeführt. Zur quantitativen Beurteilung der zirkulierenden Progenitorzellen wurden durch FACS-Analyse die CD34 und KDR positiven Zellen bestimmt.

Telmisartan 80 mg reduzierte den systolischen Blutdruck um 10%, Ramipril 10 mg um 4,5%. Bei der sonographischen Beurteilung der Hyperämie-induzierten Vasodilatation der A. brachialis zeigte Telmisartan 80 mg eine tendenzielle Steigerung der endothelabhängigen Vasodilatation (+11%,  $p=0,06$ ). Die Änderung von Ramipril 10 mg entsprach dem Placeboeffekt (+3% bzw. +2,7%). In der Behandlungsphase steigerte Telmisartan 80 mg die zirkulierenden Progenitorzellen (CD34 und KDR positiv) um  $279\pm 126\%$ ,  $p<0.05$ . Kein Unterschied zeigte sich in der Behandlungsgruppe mit Ramipril 10 mg und Placebo. Die Potenz kultivierter endothelialer Progenitorzellen, in der Zellkultur Kolonien zu bilden (colony forming units), ist ein gut charakterisierter Parameter ihrer funktionellen Kapazität. Dabei senkte Ramipril 10 mg die replikative Potenz um  $61\pm 23\%$ ,  $p<0.05$ . Telmisartan 80 mg und Placebo zeigten keine Veränderungen.

In dieser Pilotstudie an Patienten mit stabiler koronarer Herzkrankheit führte die Einnahme des AT1-Antagonisten Telmisartan zusätzlich zu einer Standardmedikation zu einer Hochregulation der zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen und einer Verbesserung der endothelialen Dysfunktion. Diese Effekte waren nach Behandlung mit dem ACE-Hemmer Ramipril oder Placebo nicht zu beobachten. Die Befunde weisen auf die Möglichkeit einer differentiellen Regulation der EPC durch unterschiedliche Inhibitoren des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems hin, welches in größeren Patientenkollektiven bestätigt werden muss.



## 1.3 Summary

### 1.3.1 Lipid-Study

Statin treatment improves vascular function, which is in part attributable to reduction of oxidative stress and improvement of endothelial function. Whether direct vascular, lipid-independent effects of statins contribute to the beneficial effects of lipid lowering remains controversial.

Healthy volunteers (n=6) were treated for 7 days with either 80 mg/d atorvastatin, 10 mg/d of the cholesterol-absorption inhibitor ezetimibe, or the combination of 10 mg/d atorvastatin and 10 mg/d ezetimibe in a double-blind, three-arm cross-over design. Atorvastatin 80 mg/d reduced LDL cholesterol by 41,5%, ezetimibe by 11,8% and the combination treatment by 47,7%. Cholesterol biosynthesis (ratio of lathosterin/cholesterin) was reduced by atorvastatin (-73%) and the combination therapy (-25%) but increased by ezetimibe (+54%). Cholesterol absorption (campesterin and sitosterin plasma concentrations) was reduced by ezetimibe and the combination, but remained unchanged during atorvastatin monotherapy. Endothelium dependent dilation of the brachial artery was improved only by the high dose statin treatment ( $3,6 \pm 3,4\%$ ). Ezetimibe reduced endothelial function ( $5,8 \pm 0,9\%$ ,  $p < 0.05$ ), whereas the combination of ezetimibe and atorvastatin had no effect ( $+1,4 \pm 3,4\%$ ).

Despite the fact that high dose atorvastatin lowers the cholesterol to the same extent as the combination of low-dose atorvastatin and ezetimibe, vascular benefit is exclusively linked to treatment with high dose atorvastatin. These findings support the concept that statin treatment provides atheroprotection, which is in part independent of lipid lowering.

### 1.3.2 RAAS-Study

Atherosclerosis is the cause of the coronary heart disease, stroke and peripheral artery disease. The atherosclerosis and endothelial dysfunction are caused by the endothelial cell apoptosis and an impaired regeneration of the endothelium with endothelial progenitor cells out of the bone marrow and by accelerated inflammatory processes in the vessels.

Endothelial dysfunction is characterized by reduced flow dependent vascular dilatation. This process accompanies an inflammatory process in the vessels and represents the early state of the atherosclerosis.

Circulating endothelial progenitor cells from the bone marrow contribute to the regeneration of cardiovascular cells. The numbers of circulating endothelial progenitor cells (EPC) correlates inversely with cardiovascular risk factors. EPC numbers correlate with improved endothelial function and cardiovascular outcome.

36 volunteers with stable coronary heart disease were included into this study. The patients were randomized in a double-blind and prospective, three-arm study: AT1-antagonist telmisartan 80 mg/d, ACE-inhibitor ramipril 10 mg/d or placebo for 3 months in addition to standard treatment of coronary heart disease. Endothelial function was determined by sonography of the endothelium dependent dilation of the brachial artery at the beginning and the end of treatment. For quantitative evaluation of the circulating progenitor cells, CD45 and KDR positive cells and the colony forming units were measured.

Telmisartan 80 mg/d reduced the systolic blood pressure by 10%, ramipril 10 mg/d by 4,5%. The measurement of the endothelium dependent dilation of the brachial artery shows an improvement of the endothelium dependent dilation for telmisartan by 11%. The alteration of ramipril was the same as placebo (+3% and 2,7%). Telmisartan enhanced the numbers of circulating progenitor cells (CD34 and KDR positive cells) by  $279 \pm 126\%$ ,  $p < 0.05$ . There was no difference between the treatment of ramipril 10 mg/d and placebo. The colony forming units are a parameter of the functional capacity of the endothelial progenitor cells. Ramipril 10 mg/d reduced the

functional capacity by  $61 \pm 23\%$ ,  $p < 0.05$ . Telmisartan and placebo caused no difference.

This pilot trial with patients with stable coronary disease suggests that the AT1 antagonist telmisartan added to a standard medication increases the number of endothelial progenitor cells and improves the endothelial dysfunction, which was not observed after treatment with the ACE-inhibitor ramipril or placebo. These findings suggest the possibility of an differential regulation of EPC by ACE-inhibitors and AT1-antagonists which have to be confirmed in further trials.

## 2. Einleitung

### 2.1. Koronare Herzkrankheit als Folge der Atherosklerose

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind mittlerweile auch weltweit die Todesursache Nr. 1. An erster Stelle dieser Gruppe von Todesursachen steht der Herzinfarkt. Herz-Kreislaufkrankungen sind die führenden Todesursachen in Deutschland und den westlichen Industrienationen (*Basha et al. 1996*). Im Jahre 2001 starben 47,2% aller Menschen an Herz-Kreislaufkrankungen, davon mehr als die Hälfte an den Folgen der koronaren Herzkrankheit. Während die Todesfälle durch Schlaganfällen in den letzten 20 Jahren bei beiden Geschlechtern langsam abnahmen, gingen die tödlichen Herzinfarkte in diesem Zeitraum nur bei den Männern, nicht jedoch bei den Frauen, zurück. Obwohl die Risikofaktoren, die zu einem Herzinfarkt führen können, schon seit langem der Ärzteschaft und der Bevölkerung bekannt sind, hat sich die Situation in Europa und insbesondere auch in Deutschland nur wenig verbessert. (*Euroaspire I and II group 2001.*)

Unbeeinflussbare Risikofaktoren sind ein fortschreitendes Alter, genetische Disposition und männliches Geschlecht. Beeinflussbare Risikofaktoren sind die arterielle Hypertonie, Hypercholesterinwerte, Rauchen, Übergewicht und Diabetes mellitus Typ 2.

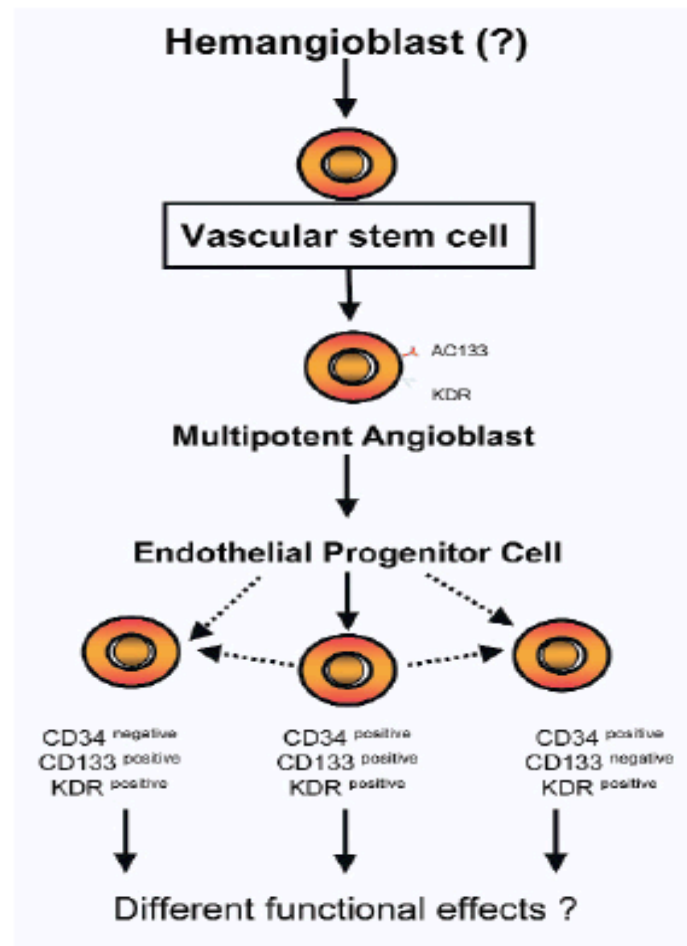
Die Koronarsklerose führt zu einer zunehmenden Lumenverminderung der Koronargefäße und somit zu einem erhöhten myokardialen Sauerstoffdefizit. Dies wiederum führt zu stabiler und instabiler Angina Pectoris, Myokardischämie, Myokardinfarkt, Herzrhythmusstörungen und Herzinsuffizienz. Schlaganfall und periphere arterielle Verschlusskrankheit sind weitere Folgeerkrankungen der Atherosklerose, und können das restliche Gefäßsystem betreffen (*Lithell 1994*). Eine Reduktion oder Vermeidung der oben genannten Risikofaktoren wirkt der Progression der Gefäßveränderung entgegen (*Grundy 1995, White 1998, Fletcher 1999*).

Chronisch erhöhtes LDL-Cholesterin bei niedrigen HDL-Spiegeln, stellt einen Pathomechanismus der Atherosklerose durch Lipideinlagerungen in der Gefäßwand dar (Ross 1999). Diese Lipideinlagerung hat das Einwandern von Makrophagen und Lymphozyten, sowie die Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren zur Folge (Ross 1986, Deedwania 1995). Durch die Anreicherung von mononukleären Zellen und durch die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen und Fibroblasten vergrößert und organisiert sich der atherosklerotische Plaque, bis der lipidhaltige Kern von einer fibrösen Kappe umgeben wird. Folge einer Plaqueruptur kann der Verschluss einer Koronararterie sein und somit zu einem Myokardinfarkt führen (Ross 1999, Libby 2001).

## **2.2 Bedeutung der endothelialen Progenitorzellen für die Homöostase und Funktion des Endothels**

Endotheliale Progenitorzellen (EPC) aus dem Knochenmark spielen eine wichtige Rolle für die Homöostase und Funktion des Endothels, und sind von großer Bedeutung im Rahmen der Angiogenese (Asahara 1997, Rosenzweig 2003). Bei der bisherigen Vorstellung spielten bei der Endothelreparatur und Angiogenese lokale Prozesse eine zentrale Rolle. Die Differenzierung der adulten Stammzelle zur endothelialen Progenitorzelle stellt ein neues Konzept dar. Zurzeit gibt es eine divergente Definition von EPC. Es wird jedoch von den meisten Autoren akzeptiert, dass Zellen mit den Oberflächenmarker CD34 und KDR als endotheliale Progenitorzellen angesehen werden. Kürzlich konnte nachgewiesen werden, dass es unterschiedliche Subgruppen der Progenitorzellen mit unterschiedlichen Funktionen gibt.

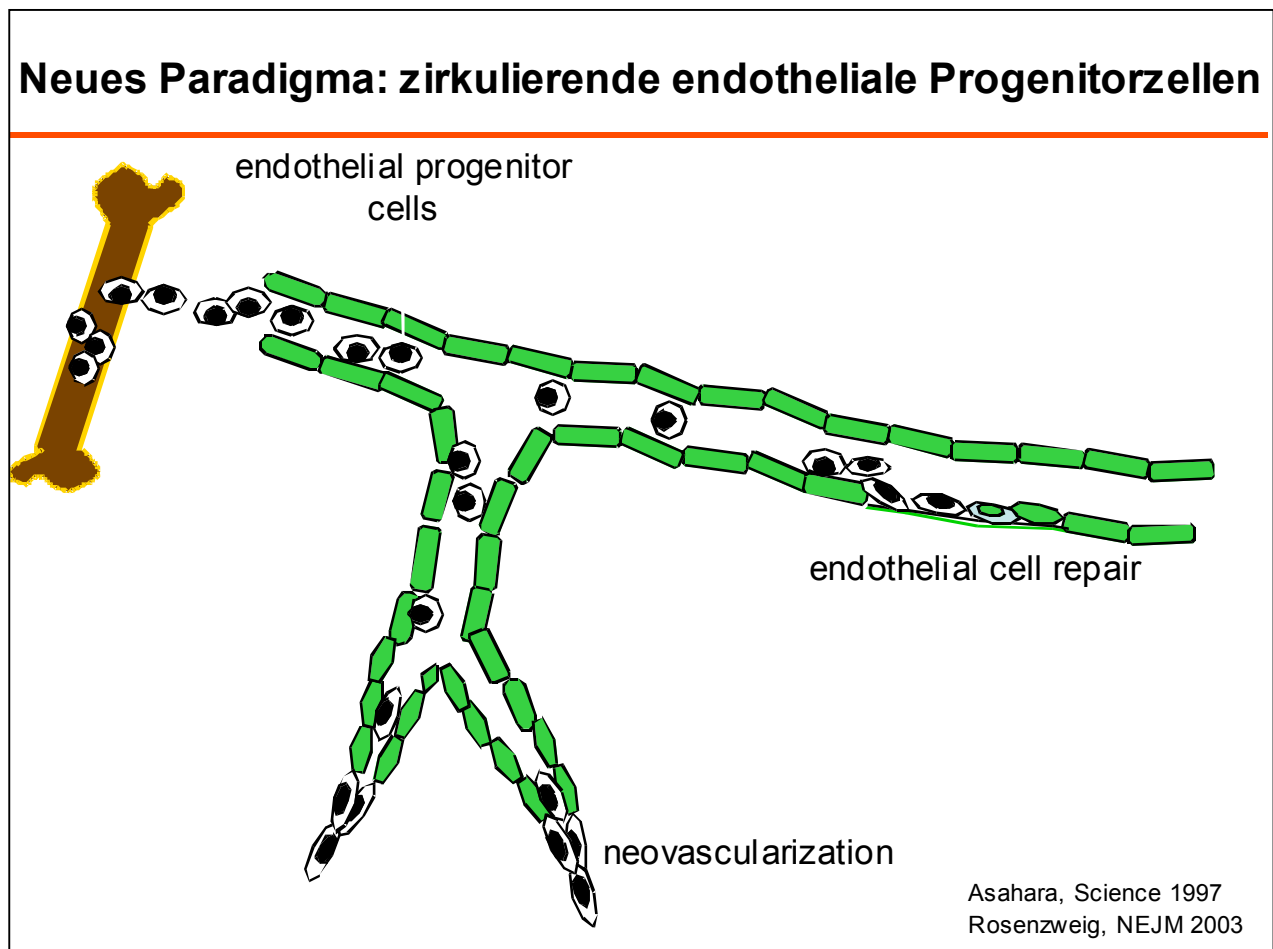
**Abbildung 1**



*Der putative Herkunftsort der endothelialen Progenitorzellen ist der Hämangioblast. Dieser differenziert sich über Zwischenstufen in die Progenitorzelle. Die Oberflächenmarker CD34, KDR, CD133 definieren den zirkulierenden Anteil der Progenitorzellen. Ob die möglichen Kombinationen der Oberflächenmarker verschiedenen funktionelle Effekte haben ist Gegenstand aktueller Studien. (Modifiziert nach Werner et al. 2006)*

1997 zeigten Asahara et al. erstmals, dass CD34 positive mononukleäre Zellen aus peripherem Blut in verletzten oder ischämischen Gefäßregionen anlagern und sich dort zu Endothelzellen differenzieren (*Asahara et al. 1997*). Folgestudien konnten gleiche Effekte im Tierversuch bei Mäusen mit kardialer Ischämie zeigen. Auch hier wurden die Zellen aus dem Knochenmark in das erkrankte Gewebe inkorporiert und differenzierten sich dort zu Endothelzellen. Die Entdeckung der EPC weist darauf hin, dass die postnatale Neovascularisation nicht alleinig abhängig von der Aussprossung vorbestehender Gefäße ist. Progenitorzellen haben somit einen großen Einfluss auf die Neoangiogenese und endotheliale Zellreparation bei kardiovaskulären Krankheiten. Diese Zellen sind negativ beeinflusst durch kardiovaskuläre Risikofaktoren. EPC verbessern die Reparationsvorgänge bei endothelialer Dysfunktion und reduzieren den Fortschritt der atherosklerotischen Läsionen. Dabei korreliert die Zahl der zirkulierenden CD34 und KDR positiven monozytären Zellen mit dem Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen und stellt einen Marker für die gefäßprotektive Potenz einer therapeutischen Maßnahme dar (*Schmidt-Lucke et al. 2005, Fadini et al. 2006*). EPC sind prädiktive Marker für kardiovaskuläre Ereignisse und Sterblichkeit (*Werner et al. 2005*). Es wird derzeit geprüft, ob sich Progenitorzellen für die Angiogenese nach Myokardinfarkt und für die Therapie der Herzinsuffizienz nutzen lassen. Es ist bekannt, dass die Anzahl und Funktion der EPC durch Risikofaktoren wie Rauchen, Hypertonie und Hypercholesterinämie reduziert wird. Die Hochregulation der Progenitorzellen ist für verschiedene Medikamente, wie zum Beispiel für Statine, oder für körperliches Ausdauertraining bereits beschrieben (*Dimmeler et al. 2001, Laufs et al. 2004*). Wir untersuchten daher die Frage, ob eine Behandlung mit einem AT1-Antagonisten im Vergleich zu einem ACE-Hemmer, zu einer differentiellen Regulation der EPC führt.

Abbildung 2



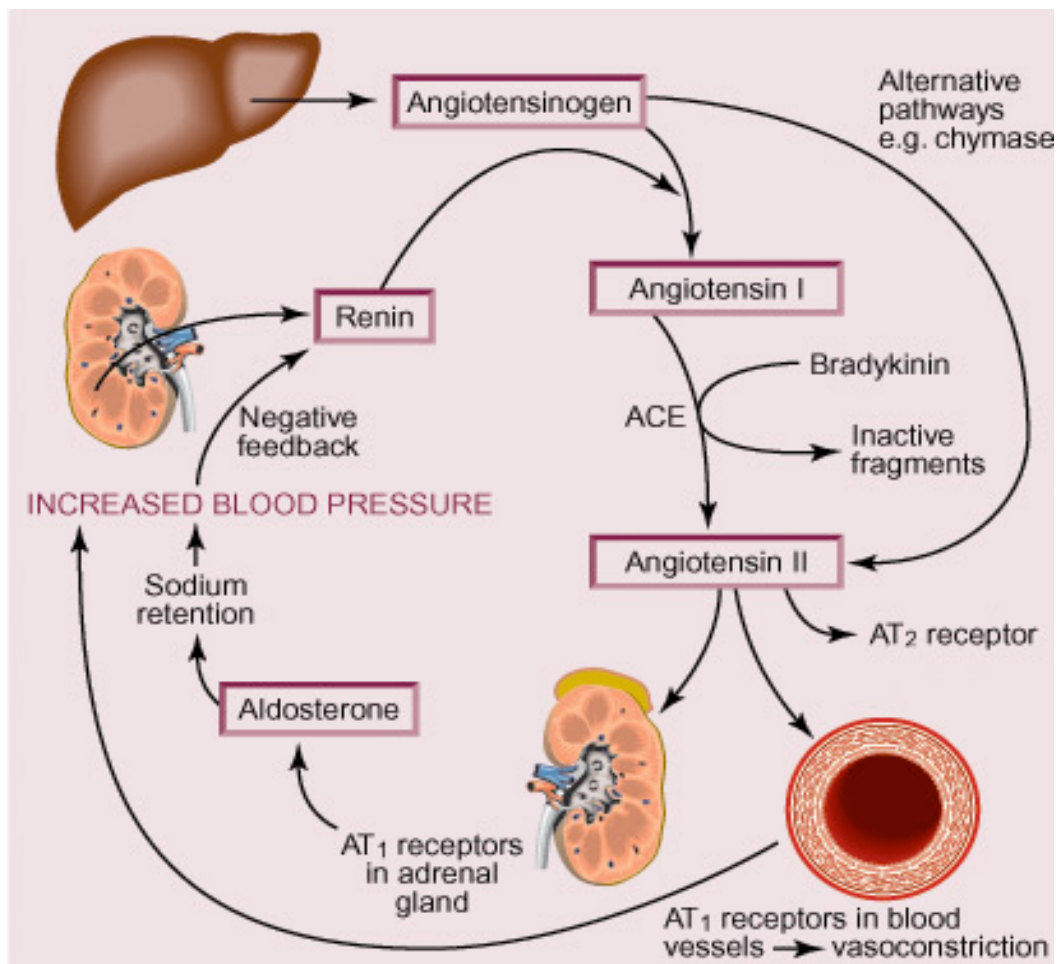
*Bei der bisherigen Vorstellung spielten bei der Endothelreparatur und Angiogenese lokale Prozesse eine zentrale Rolle. Die Differenzierung der adulten Stammzelle zur endothelialen Progenitorzelle stellt ein neues Konzept dar. EPC stehen im Mittelpunkt bei endothelialen Reparatursprozessen und bei der Neoangiogenese.*



## 2.3 Physiologie des Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)

Vor über 100 Jahren entdeckten Tigerstedt und Bergman, dass die Injektion von Extrakten aus den Nieren von Kaninchen Effekte auf den Blutdruck haben. Sie nannten diese Substanz Renin, von dem später nachgewiesen wurde, dass diese Substanz eine Protease ist. Braun-Menendez und Mitarbeiter (1939), sowie Page und Helmer (1940), isolierten eine hypertensive Substanz aus dem Blut, das Angiotensin. Angiotensin ist die biologisch aktive Substanz, die durch Renin gebildet wird.

Abbildung 3



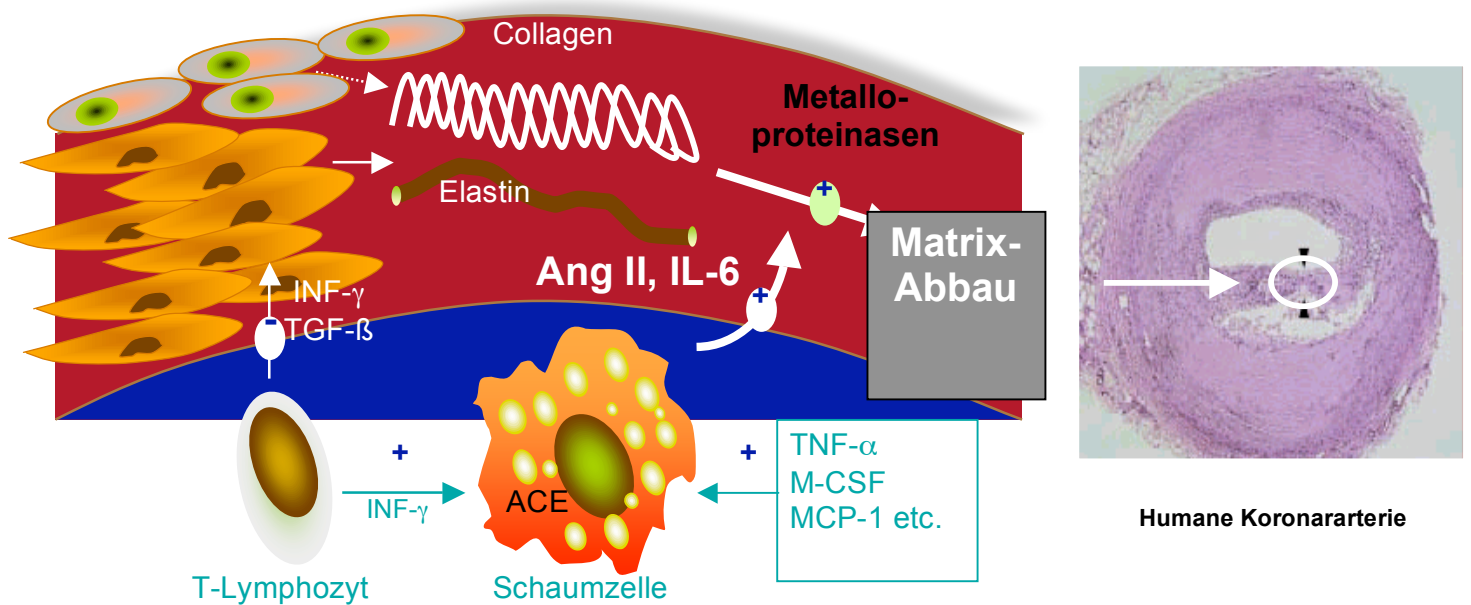
*Physiologie des Renin-Aldosteron-Angiotensin-Systems. Renin spaltet aus Angiotensinogen Angiotensin I ab. Das Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) spaltet Angiotensin I in Angiotensin II. Angiotensin II bindet an den AT<sub>1</sub> und AT<sub>2</sub> Rezeptor. Effekte am AT<sub>1</sub> Rezeptor führen u.a. zur Steigerung des Blutdrucks. Angiotensin II kann über alternative Wege wie z.B. Chymasen hergestellt werden.*

Renin ist eine Protease, welche in den juxtaglomerulären Zellen der Niere gebildet und von dort aus in das Blut abgegeben wird. Es spaltet aus einem vor allem in der Leber gebildeten Decapeptid, dem Angiotensinogen, das Angiotensin I ab. Das Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) spaltet Angiotensin I in Angiotensin II. Angiotensin II bindet an den AT1 und AT2 Rezeptor.

Neben dem zirkulierenden, im Plasma vorliegenden, besteht auch ein lokales, im Gewebe vorliegendes Renin-Angiotensin-System (*Schunkert et al. 1993, Vilareal et al. 1993, Iwai et al. 1995*). Das Verhältnis des zirkulierenden zu dem lokalen System beträgt ungefähr 1:9.

Die Bindung von Angiotensin II am AT1-Rezeptor, führt u.a. zu einer vermehrten Sauerstoffradikalfreisetzung aus glatten Gefäßmuskelzellen (*Griendling et al. 1993, Nickenig et al. 1996, 1998 und 2000*). Sauerstoffradikale beeinträchtigen die Endothelfunktion und beschleunigen die Progression atherosklerotischer Läsionen, indem sie die Oxidation von Lipiden und Stickstoffoxid, sowie die Expression proinflammatorischer Gene, fördern (*Griendling et al. 2001, Heitzer et al. 2001*). Die Freisetzung freier Radikale wird durch eine Angiotensin II induzierte Aktivitätssteigerung der NADPH-Oxidase bewirkt (*Griendling et al., 1994*). Der NADPH-Oxidase-Komplex von glatten Gefäßmuskelzellen wird als die wichtigste Quelle für das Sauerstoffradikal Superoxid in der Gefäßwand erachtet (*Sorescu, 2001*). Diese reaktive Sauerstoffspezies reguliert zelluläre Funktionen wie z.B. Wachstum (Hypertrophie und Hyperplasie), Migration und Inflammation, sowie endotheliale Dysfunktion, welche eine wichtige Rolle für die Entstehung der Atherosklerose spielen (*Sorescu, 2001*).

**Abbildung 4**



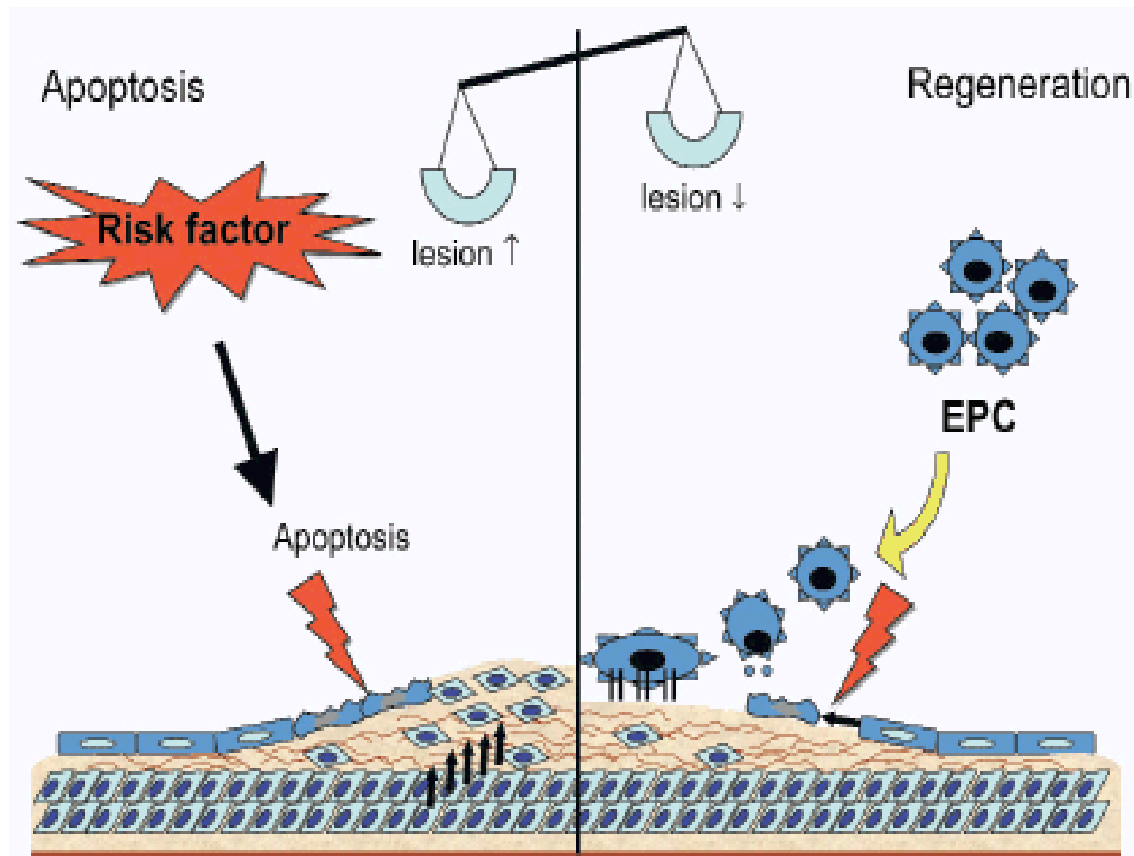
Im Verlauf der Atherosklerose kommt es zur vermehrten Adhäsion und Invasion von Monozyten in den subendothelialen Raum. Nach Aufnahme von Lipiden in die Makrophagen folgt die Formation zur Schaumzelle. Die Produktion lokaler Wachstumsfaktoren wie Adhäsionsmoleküle, Zytokine z.B. Interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), Tumornekrosefaktor (TNF- $\alpha$ ), Makrophagen-Colonie-Stimmulierender-Faktor (M-CSF), Monocyte chemoattractant Protein-1 (MCP-1) Transforming grow factor (TGF- $\beta$ ), Angiotensin II (Ang II), Interleukin 6 (IL-6), sowie Metalloproteinasen führen schließlich zur Proliferation glatter Muskelzellen und haben eine Einengung des Lumens zur Folge.

## **2.4 Bedeutung der endothelialen Dysfunktion in der Pathogenese der Atherosklerose**

Endotheliale Dysfunktion stellt die früheste bedeutsame vaskuläre Funktionsstörung in der Entwicklung atherosklerotischer Erkrankungen dar (*Blann und Lip 1998, Forgione et al. 2000*). Der Begriff der endothelialen Dysfunktion bezeichnet einen Zustand, der mit Verlust der zellulären Integrität des Gefäßendothels einhergeht, und infolgedessen das Endothel seine adaptiven Fähigkeiten zur Kontrolle der basalen vaskulären Funktion verliert (*Gimbrone 1995*). Der Funktionsverlust manifestiert sich entweder durch eine verminderte Sekretion von endotheleigenen Vasodilatoren, insbesondere von NO, einer gesteigerten Produktion von Vasokonstriktoren und/oder durch Unempfindlichkeit des glatten Gefäßmuskels gegenüber den vom Endothel produzierten Vasodilatoren (*Mombouli und Vanhoutte 1999, Loscalzo 2001*). Prädisponierend wirkt sich hierbei die exponierte Lage der Endothelzellen aus, die sie für endoluminale Einflüsse vulnerabel macht. Endothelschädigend sind kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Rauchen, Hyperlipidämie, Hypertonus, Diabetes mellitus, oxidativer Stress und die damit verbundenen pathophysiologischen zellulären Mechanismen (*Heitzer et al. 1996, Steinberg et al. 1997, Cines et al. 1998, Forgione et al. 2000, Cai und Harrison 2000*).

Diese Risikofaktoren vermindern die endotheliale NO-Freisetzung und stehen dadurch am Anfang einer Reihe weiterer pathologischer Prozesse innerhalb der Pathogenese atheromatöser Gefäßwandveränderungen (*Ross 1995, Liao et al. 1995*). Verminderte Mengen an NO fördern die Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten und die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen (*Cooke und Tsao 1994*). Endothelzellen exprimieren Adhäsionsmoleküle wie VCAM-1 und ICAM-1, durch die Leukozyten an die Zellen binden können und im Verlauf in das Gewebe eindringen (*Cybulsky und Gimbrone 1991, Poston et al. 1992, Cines et al. 1998*). Auch Lipoproteine wie LDL können so in die Gefäßwand eindringen und werden währenddessen oxidiert (*Ross 1995*). Die Wiederherstellung der endothelialen Funktion, ist neben der Ausschaltung schädlicher Noxen das Ziel einer pharmakologischen Intervention. Eine wichtige Rolle spielt hierbei die Reduktion von LDL-Cholesterin durch HMG-CoA-Reduktasehemmer (*Dupuis et al. 1999, Schwartz et al. 2001*).

**Abbildung 5**



*Endotheliale Dysfunktion als Ungleichgewicht zwischen apoptotischen Vorgängen und Reparationsvorgängen. Im Ungleichgewicht durch erhöhte Apoptose oder verminderte Regeneration ist der gemeinsame Endpunkt der Funktionsverlust des Endotheliums und somit Entwicklung und Fortschritt der Atherosklerose. (Modifiziert nach Werner et al. 2006)*

## **2.5 Bedeutung von Cholesterinsynthesehemmern und Cholesterinaufnahmehemmern bei der Pathogenese der Atherosklerose**

Die Plasmacholesterinkonzentration korreliert mit der kardiovaskulären Morbidität und Mortalität, wobei cholesterinsenkende Maßnahmen das kardiovaskuläre Risiko reduzieren (*National Cholesterol Education Programm 2002, Buchwald et al. 2001*). HMG-CoA-Reduktase Hemmer (Statine) inhibieren die endogene Cholesterinbiosynthese und reduzieren die kardiovaskuläre Ereignisrate bei Patienten mit erhöhten und normalen Plasmacholesterinkonzentrationen (*Heart Protection Study Group 2002, Sever et al. 2003*).

Experimentelle und klinische Studien weisen darauf hin, dass Statine zusätzlich zu der LDL-Senkung positive Effekte besitzen können. Günstige klinische Effekte zeigen sich bereits nach 24 h, vor Senkung des LDL Cholesterin und bei Endorganschäden wie z.B. Herzinsuffizienz oder Herzhypertrophie, welche sich unabhängig von der Hypercholesterinämie entwickeln (*Wassmann et al. 2003, Liao und Laufs 2004*).

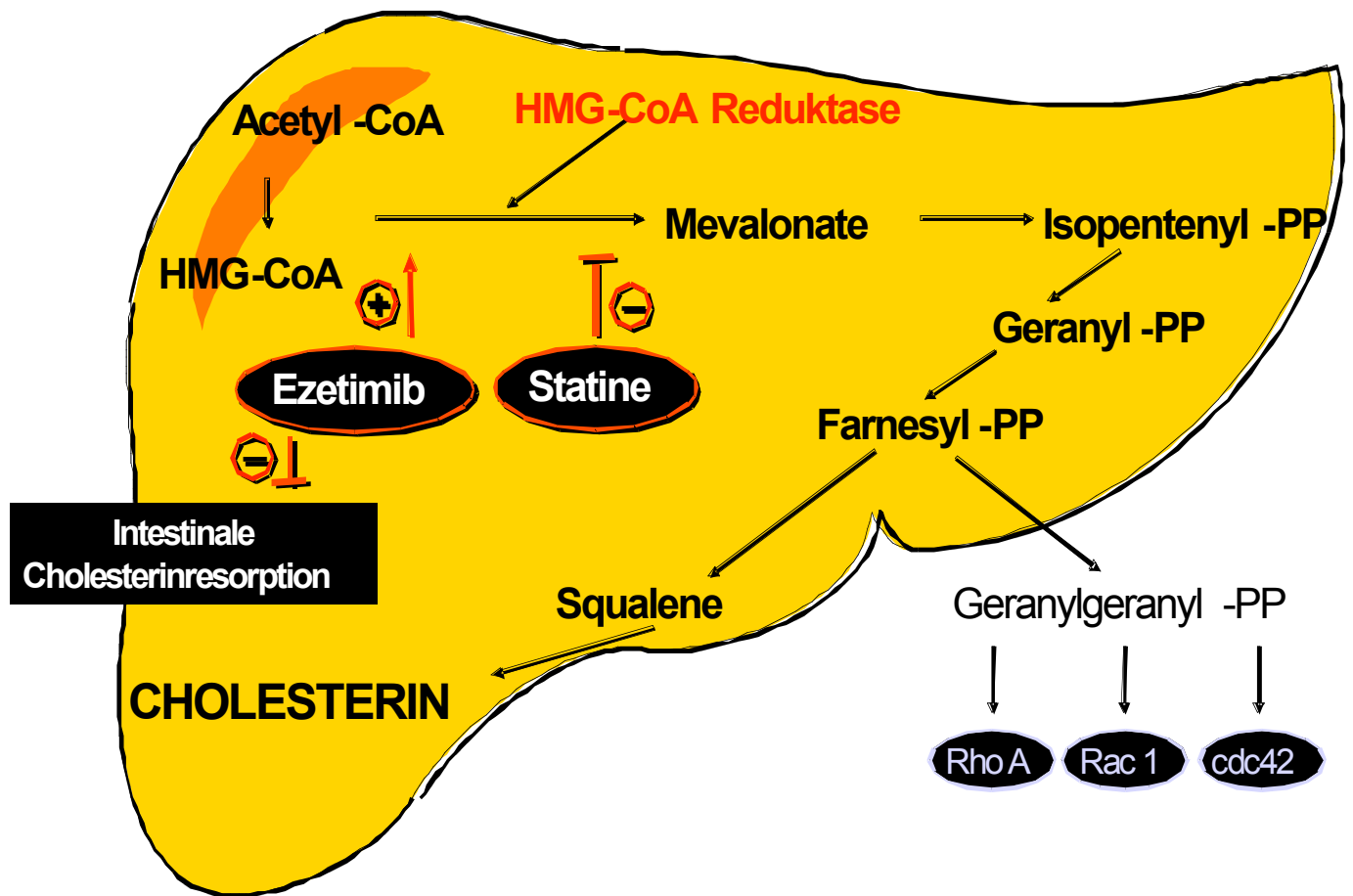
Diese sogenannten „pleiotrophen“ Effekte erklären sich aus einer direkten Wirkung von Statinen auf kardiovaskulären Zellen, was zu einer Zunahme der NO-Bioverfügbarkeit führt und den oxidativen Stress und antiinflammatorische Prozesse reduziert. In experimentellen Systemen ist dies durch eine Reduktion der Isoprenylierung von Proteinen erklärt, welche signifikant zu den oben erwähnten Molekulareffekten beiträgt. Besonders die Aktivität der Familie der Rho-Proteine, mit den kleinen GTP bindenden Proteinen, ist von der Isoprenylierung abhängig (*Liao und Laufs 2004*).

Die Inhibition der Rac1 GTPase mit Statinen reduziert den oxidativen Stress und verbessert dadurch die vaskuläre Entzündung und somit die Endothelfunktion (*Liao und Laufs 2004, Maack et al. 2003, Wassmann et al. 2001, Wagner et al. 2000*).

Die quantitative Bedeutung dieser sog. „pleiotrophen“ Effekte beim Menschen ist nicht bekannt.

Bei Patienten mit Hypercholesterinämie reduziert die Inhibition der intestinalen Cholesterinabsorption mit Ezetimib, die LDL Plasmakonzentration (*Dujovine et al. 2002, Knopp et al. 2002*). Ezetimib blockiert im Darmlumen das „Niemann-Pick C1 Like 1 Protein“ und hemmt somit die intestinale Cholesterinaufnahme (*Altmann et al. 2004*). Die intestinale Hemmung der Cholesterinaufnahme hat über einen feedback Mechanismus eine Steigerung der hepatischen Cholesterinsynthese zur Folge. D.h. Ezetimib steigert auch die hepatische Synthese der Isoprenoide. Der Effekt von Ezetimib auf das Plasmacholesterin wird durch die kompensatorische Zunahme der hepatischen Cholesterinbiosynthese gehemmt (*Sudhop et al. 2003*). Wenn Ezetimib mit einem Statin kombiniert wird, werden beide, Absorption und Synthese, von Cholesterin gehemmt. Dieser Synergismus führt zu einer profunden Reduktion des Plasmacholesterins, sogar wenn nur niedrige Statindosen verabreicht werden (*Gagne et al. 2002*). Der Vergleich dieser beiden Therapiemanagements kann dabei helfen zu klären, ob bei gleicher Cholesterinsenkung differentielle Effekte auf die Isoprenoid-Synthese mit unterschiedlichen vaskulären Effekten assoziiert sind.

Abbildung 6



Physiologie der Cholesterinbiosynthese und pharmakologische Möglichkeiten der Inhibition. Hemmung der HMG CoA Reduktase durch Statine führt zum Abbruch der Reaktionskette. Eine Hemmung der intestinalen Cholesterinresorption durch Blockung des Niemann-Pick C1 Like 1 Protein durch Ezetimibe führt hingegen über einen feedback Mechanismus zu einer gesteigerten Cholesterinsynthese. Hierbei werden auch vermehrt Zwischenprodukte die Isoprenoide, hergestellt. Die gesteigerte Synthese von Farnesylpyrophosphat führt zu einer erhöhten Isoprenylierung der Familie der kleinen G-Proteine wie z.B. Rho A, Rac 1, cdc42.



## 2.6 Fragestellungen

1. Gibt es eine differentielle Regulation der Endothelfunktion durch HMG CoA Reduktasehemmer im Vergleich zu dem Cholesterinaufnahmehemmer Ezetimib?
2. Gibt es differentielle Effekte von AT1-Rezeptor-Antagonisten im Gegensatz zu ACE-Hemmern auf die Endothelfunktion?
3. Existieren differentielle Effekte von AT1-Rezeptor-Antagonisten im Vergleich zu ACE-Hemmern auf die Anzahl zirkulierender endothelialer Progenitorzellen?

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1 Methoden**

##### **3.1.1. Design Lipidstudie**

Das Studiendesign dieser Untersuchung war prospektiv, doppelblind und als Drei-Arm-Crossoverstudie angelegt. Atorvastatin 80 mg (Sortis, Pfizer), Ezetimib 10 mg (Ezetrol, MSD) und Atorvastatin 10 mg + Ezetimib 10 mg wurden von der Universitätsapothek in neue Kapseln eingefüllt und randomisiert. Es nahmen sechs männliche, gesunde, nicht rauchende Probanden an der Studie teil. Die Teilnehmer hatten keine medizinisch relevante Vorerkrankungen, keine vaskulären Risikofaktoren und nahmen keine Medikamente ein. Jede der drei Medikationen wurde für sieben Tage eingenommen. Darauf folgte eine siebentägige Auswaschphase. Die Messungen wurden am Morgen des ersten Studientages und jedem siebten Studientag gemacht. Die Messung beinhaltet eine ultraschallbasierte Untersuchung der Endothelfunktion der A. brachialis und eine Blutentnahme aus der Kubitalvene zur Bestimmung von Lipiden, Sterolen und Laborparametern.

##### **3.1.1.1 Messung der Lipide und Sterole**

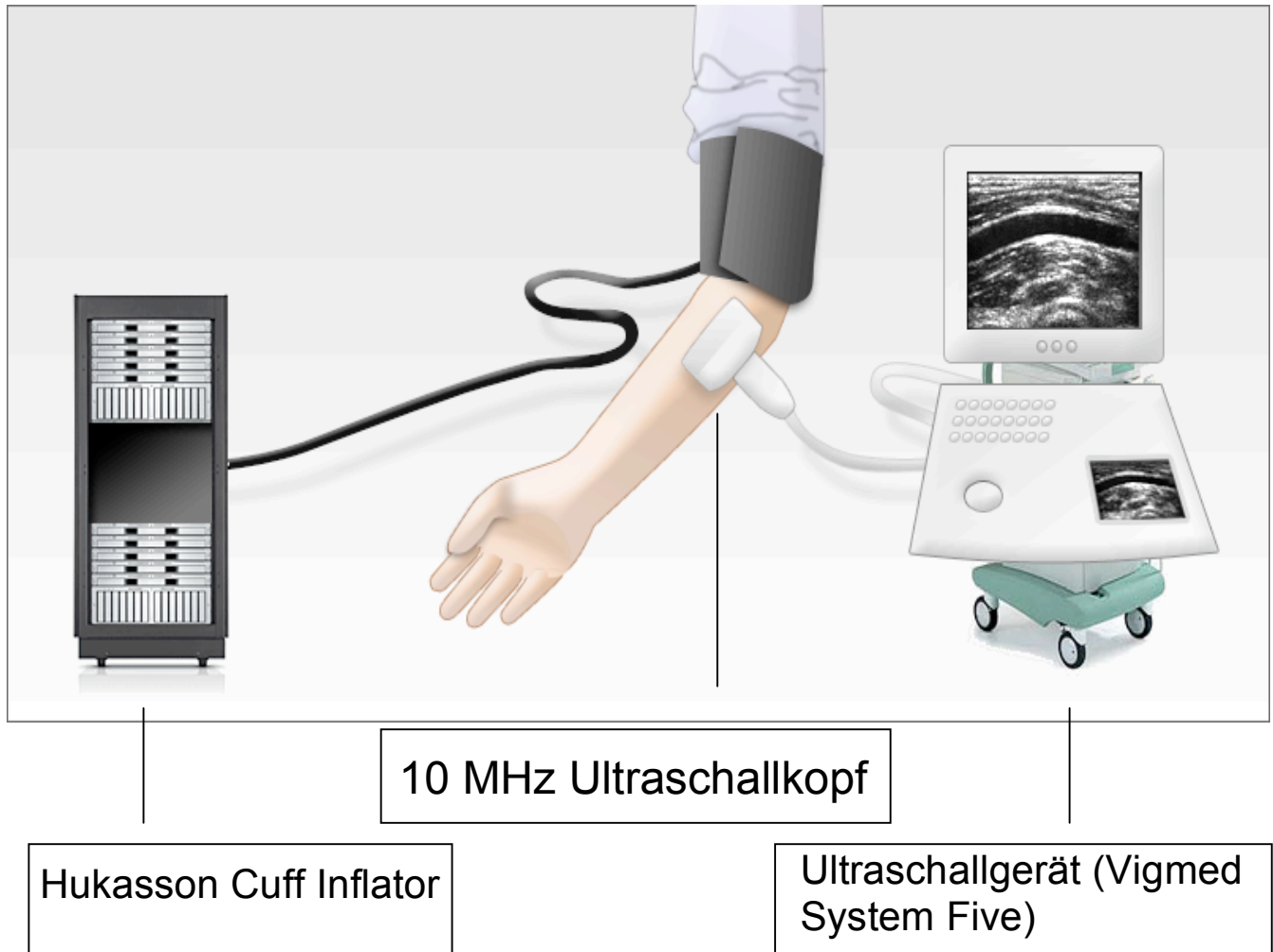
Das Gesamtcholesterin und die Triglyceride im Serum wurden mit enzymatischen Methoden in Kollaboration mit dem Institut für Klinische Pharmakologie, Universität Bonn gemessen (*Sudhop et al. 2002*). High-density lipoprotein (HDL) wurde aus dem Überstand nach Präzipitation von Apolipoprotein B enthaltenden Lipoproteinen bestimmt. Low-density lipoprotein (LDL) wurde mit der Friedwald-Formel errechnet. Lathosterol, Campesterol und Sitosterol wurden ebenfalls aus diesen Blutproben bestimmt. High-sensitivity C reaktive protein (hs-CRP) wurde mit einem latexverstärkten „turbidimetric Assay“ gemessen (Roche, Grenzach-Wyhlen, Germany).

### **3.2.1 Messung der Endothelfunktion**

#### **3.2.1.1 Messung der endothelabhängigen Vasodilatation**

Die Messung der reaktiven, hyperämischen Vasodilatation der A. brachialis in der Fossa antecubita erfolgte durch ein hochauflösendes Ultraschallgerät (Vingmed System Five, General Electrics Medical Systems) und einem 10 MHz Schallkopf. Während der sonographischen Untersuchung wurde der Unterarm des Probanden durch eine Fixationsschiene gegen Erschütterungen und Bewegungen geschützt. Die Ruhemessung des Gefäßes wurde, nachdem die Patienten 15 Minuten still gelegen hatten, aufgenommen. Danach wurde mittels Cuff der Blutfluss am Oberarm für 5 Minuten gestaut. Der Druck des Cuffs lag dabei 50 mmHg über dem jeweiligen systolischen Blutdruck der Probanden und wurde maschinell (Hukasson Cuff Inflator) aufgepumpt und abgelassen. Nach 5 Minuten Ischämiezeit wurde der Cuff deflatiert. Anschließend wurde die maximale reaktive, hyperämische Vasodilatation, 30 und 60 Sekunden nach Deflation, per Ultraschall gemessen.

Abbildung 7



*Technische Durchführung der Endothelfunktionsmessung. Messung der endothelabhängigen Vasodilatation durch automatische Luftinflation in eine Blutdruckmanschette mittels Hukasson Cuff Inflator. Nach 5 Minuten Ischämiezeit automatische Deflation durch Hukasson Cuff Inflator und Messung der reaktiven Hyperämie der A. brachialis per hochauflösendem 10 Mhz Ultraschallkopf. Während der Messung war der Unterarm durch eine Fixationsschiene vor Bewegungen gesichert.*

### **3.2.1.2 Messung der endothelunabhängigen Vasodilatation**

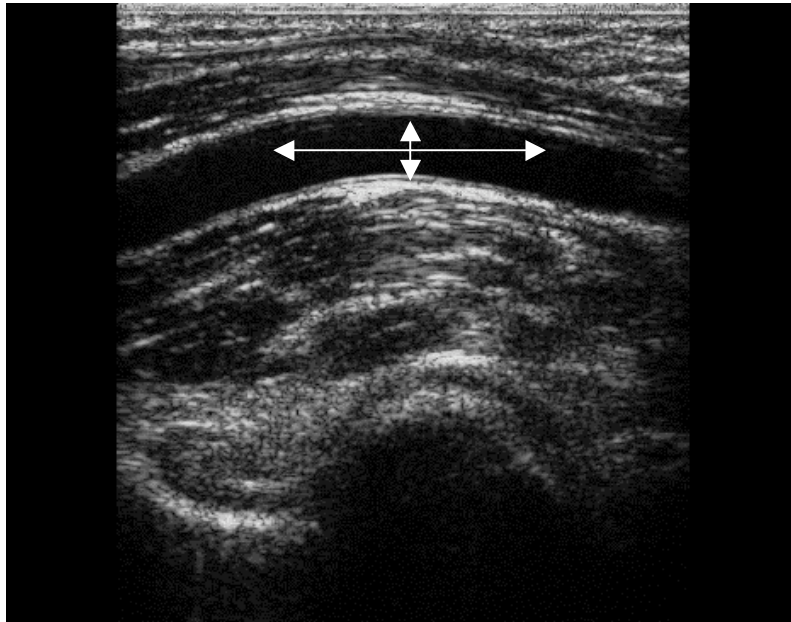
Nach zehnminütiger Ruhephase wurde eine erneute Ruhemessung der A. brachialis durchgeführt. Den Probanden wurden 0,8 mg Nitroglycerin (Pohl Boskamp, Hohenlockstedt, Deutschland) per os appliziert. Die Vasodilatation wurde nach einer, zwei, drei und vier Minuten nach Medikamentengabe gemessen. Auch bei dieser Messung war der Arm des Patienten durch eine Unterarmfixationsschiene vor Bewegungen gesichert.

### **3.2.1.3 Analyse der Messdaten**

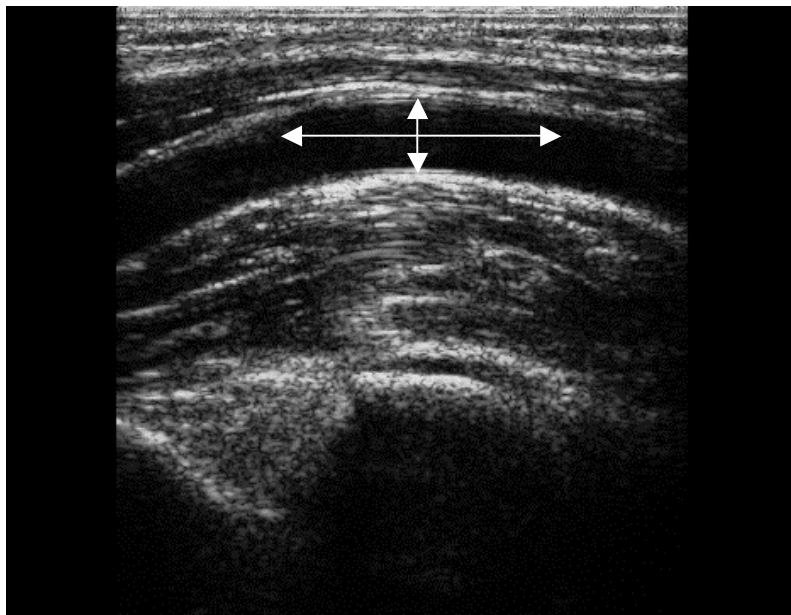
Die Fläche der longitudinal gemessenen Gefäßabschnitte wurde mit der Lucia G Vermessungssoftware Version 4.81 (LIM, Prag) gemessen. Dabei wurde bei der endothelabhängigen Vasodilatation der Ruhewert mit dem Wert der maximalen reaktiven Hyperämie bei 60 Sekunden nach Deflation gemessen. Bei der endothelunabhängigen Vasodilatation wurde der Ruhewert mit dem Wert der maximalen Vasodilatation bei Nitrogabe nach 4 Minuten verglichen. Aus der sonographisch aufgezeichneten Bilderfolge wurde durch EKG-Kontrolle das Bild mit der maximalen Vasodilatation in der Ruhemessung und der Dilatationsmessung gewählt. Diese ergab sich aus dem Bild das zeitgleich mit Beginn des QRS-Komplexes aufgezeichnet wurde. Mittels Vermessungssoftware wurde die Fläche des Gefäßes vermessen. Die prozentuale Änderung ergab sich aus der Flächendifferenz der beiden zu betrachtenden Bilder.

## Abbildung 8

Ruhemessung



Messung bei Hyperämie



*Beispiel für die automatische Berechnung der Hyperämie induzierten Vasodilatation durch Ultraschallmessung der A. brachialis. Berechnete Fläche von  $1,94 \text{ cm}^2$  bei der Ruhemessung, hingegen eine Fläche von  $2,13 \text{ cm}^2$  bei maximaler hyperämischer Vasodilatation. Die Berechnung erfolgte mittels Lucia G Vermessungssoftware.*

### **3.3.1 Design RAAS-Studie**

Das Studiendesign wurde prospektiv, placebokontrolliert, doppelblind und monozentrisch angelegt. Männliche und weibliche Probanden (n=36) im Alter von 41 bis 73 Jahren wurden in der Studie untersucht. Einschlusskriterien waren eine stabile Angina pectoris und eine angiographisch nachgewiesene koronare Herzerkrankung. Ausgeschlossen wurden Patienten mit akutem Koronarsyndrom, akuter Herzinsuffizienz, höhergradigen Klappenvitien, Leber- oder Niereninsuffizienz, Schwangere und psychisch kranke Patienten. Die Studie wurde durch die Ethikkommission des Saarlandes genehmigt.

Die Studienmedikation bestand aus Telmisartan 80 mg/d oder Ramipril 10 mg/d oder Placebo. Die Studienmedikation wurde über 3 Monate einmal täglich von den Probanden selbstständig eingenommen. Die Medikation wurde in der Krankenhausapothek der Uniklinik Homburg verkapselt und randomisiert.

Zu Beginn der Studie wurde eine ultraschallbasierte Untersuchung der Endothelfunktion der A. brachialis, sowie eine Messung der zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen vorgenommen. Anschließend folgte eine dreimonatige Therapiephase. Nach Abschluss der Behandlung wurde die Messung der Endothelfunktion und der zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen wiederholt. Die Probanden erhielten im Untersuchungszeitraum keinen zusätzlichen ACE-Hemmer oder AT1-Antagonisten von ihrem Hausarzt. Die weitere medikamentöse Behandlung der koronaren Herzerkrankung, mit Aspirin, Statine,  $\beta$ -Blocker, erfolgte nach den gegenwärtigen Leitlinien und wurde von dieser Studie nicht berührt.

### **3.3.2. Isolation zirkulierender humaner EPC Subpopulationen**

Zur Gewinnung humaner EPC wurde den Probanden peripher venöses Blut in 4x5 ml Citratröhrchen (Sarstedt) entnommen. Das Blut wurde in 30 ml PBS-Lösung verdünnt und anschließend mittels Dichtegradienten in lymphozytäre, mononukleäre und erythrozytäre Fraktionen aufgetrennt. Die EPC wurden aus der mononukleären Zellschicht, dem Buffycoat, entnommen, um weiter isoliert zu werden. Hierzu wurden die Blutproben mit PBS ohne Ca (22 °C) 1:1 verdünnt und auf Biocolllichtegradientenlösung (Biochrom) geladen. Die Proben wurden anschließend für 20 min bei 2000 rpm und 22 °C ohne Bremse zentrifugiert. Der Buffycoat wurde abgesaugt und wiederum 1:1 mit PBS ohne Ca (4 °C) verdünnt und für 5 min bei 1500 rpm und 4 °C mit Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1000 µl PBS ohne Ca (22 °C) resuspendiert und in einer 1:100 Verdünnung in einer Neubauerzählkammer gezählt. Anschließend wurden die Zellen für die im Folgenden beschriebenen Versuche mit Antikörpern gebunden und per Durchflusszytometrie gemessen.

Alle Untersuchungen und Blutentnahmen wurden mit dem schriftlichen Einverständnis der Probanden durchgeführt.

### **3.3.3. Durchflusszytometrie/ FACS**

#### **3.3.3.1. Prinzip der Durchflusszytometrie/ FACS**

Das Grundprinzip der Durchflusszytometrie ist die Messung von abstrahlendem Licht und spezifischer Fluoreszenzen von großen Zellzahlen innerhalb kurzer Zeit. Dabei werden Zellen mittels eines Lasers mit spezifischer Wellenlänge bestrahlt. Das Licht strahlt durch die Zellen hindurch (als forward scatter bezeichnet) oder wird von ihnen reflektiert (als side scatter bezeichnet) und wird über Photodetektoren gemessen. Dadurch werden einzelne Zellen registriert und können quantifiziert werden. Meist sind die Zellen zusätzlich mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert, die an die Wellenlänge des Lasers angepasst sind. Das von spezifischen Fluoreszenzen

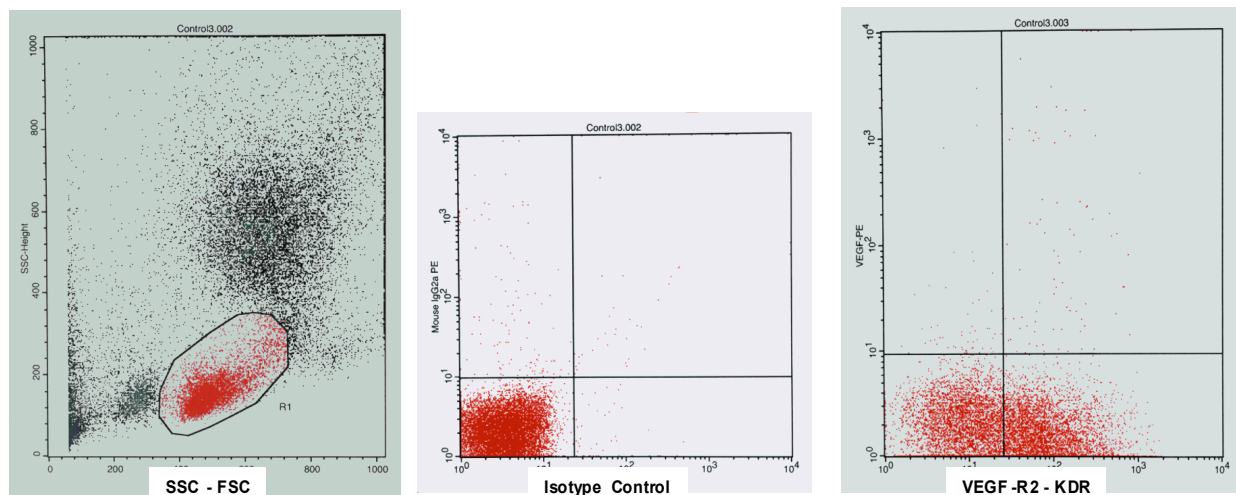


emittierte Licht wird von wellenlängenspezifischen Lichtfiltern resorbiert und in elektrische Signale umgewandelt. Diese Daten werden durch einen Computer verrechnet und durch ein Punkteschema auf dem Bildschirm sichtbar gemacht. Anhand des Punkteschemas lassen sich unterschiedliche Zellpopulationen mit spezifischen fluoreszierenden Antikörpern markierte Zellen identifizieren und quantifizieren.

**Abbildung 9**

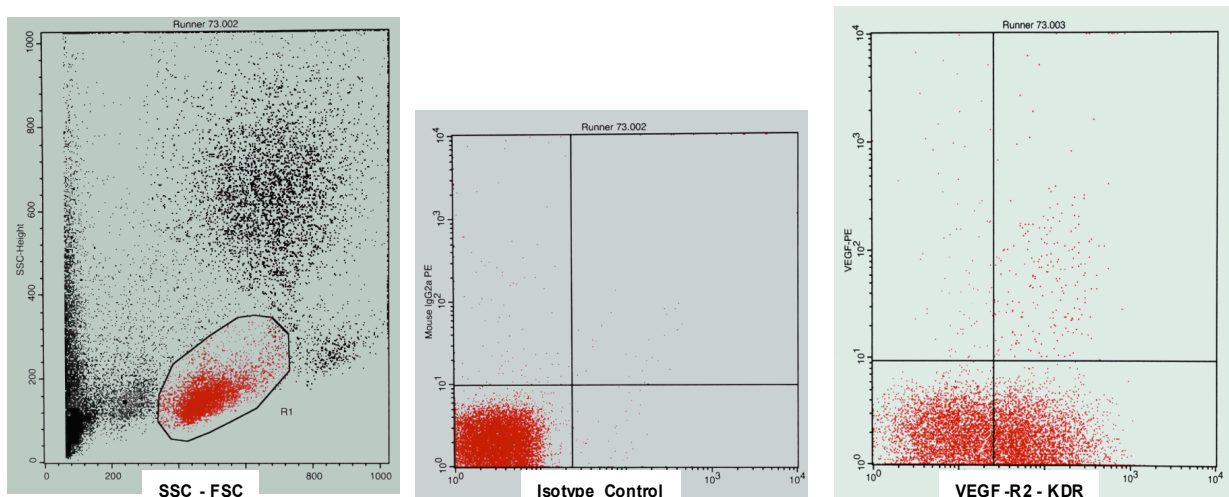
**A**

**Telmisartan - pre**



**B**

**Telmisartan - post**



*Beispiel für eine FACS Analyse für VEGF-R2-KDR positive mononukleäre Zellen. Vergleich vor und nach Einnahme von 80 mg Telmisartan für 3 Monate. Im rechten oberen Quadranten der VEGF-R2-KDR Auswertung sind nach der Behandlungsphase mit Telmisartan 80 mg/d deutlich mehr positive Ereignisse zu sehen. Dies zeigt eine Zunahme der EPC in der Behandlungsphase.*

### 3.3.3.2 Analyse der EPC-Populationen mittels Durchflusszytometrie

Die Untersuchung der CD34+/CD133+ und der CD34+/VEGFR-2+ EPC, sowie die Isotypenkontrolle, wurde mittels der Durchflusszytometrie (FACS) durchgeführt. Alle Zellsuspensionen jedes Probanden unterliefen jeden hier aufgeführten Ansatz. Die Isotypenkontrollen wurden nur mit den Fluoreszenzen (PE, FITC) entsprechenden, nicht spezifisch bindenden Antikörpern versehen, um unspezifische Bindungen im Vergleich auszuschließen. Die Antikörper CD34 FITC (BD Biosciences Pharmingen) und CD133 PE (Miltenyi Biotec) sind direkt an ihre Fluoreszenz gekoppelt. Nach der oben beschriebenen Isolation wurden die in EBM resuspendierten Zellsuspensionen der mononukleären Zellen auf FACS Röhrchen (BD Becton Dickinson) zu 100 µl aufgeteilt. Für die Ansätze CD34+/CD133+ und die Isotypenkontrolle wurde der erste Antikörper (CD34FITC, bzw. IgG FITC bei der Isotypenkontrolle) direkt beigefügt und dann 20 min bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Im Anschluss folgten erneut 20 min Inkubation mit dem zweiten Antikörper (CD133PE bzw. IgG PE (BD Biosciences Pharmingen) bei der Isotypenkontrolle) unter denselben Bedingungen. Daraufhin wurden die Zellsuspensionen jeweils durch Zugabe von 2 ml Cell Wash (BD Pharmingen) und Zentrifugation für 10 min bei 1300 rpm und 4°C mit Bremse, sowie Verwerfung der Überstände, gewaschen. Hierdurch sollten überschüssige und nicht bindende Antikörper aus der Zellsuspension herausgespült werden. Danach wurden Cell Wash und PFA 2% (Merck) appliziert und die Zellen durch FACS-Analyse gemessen.

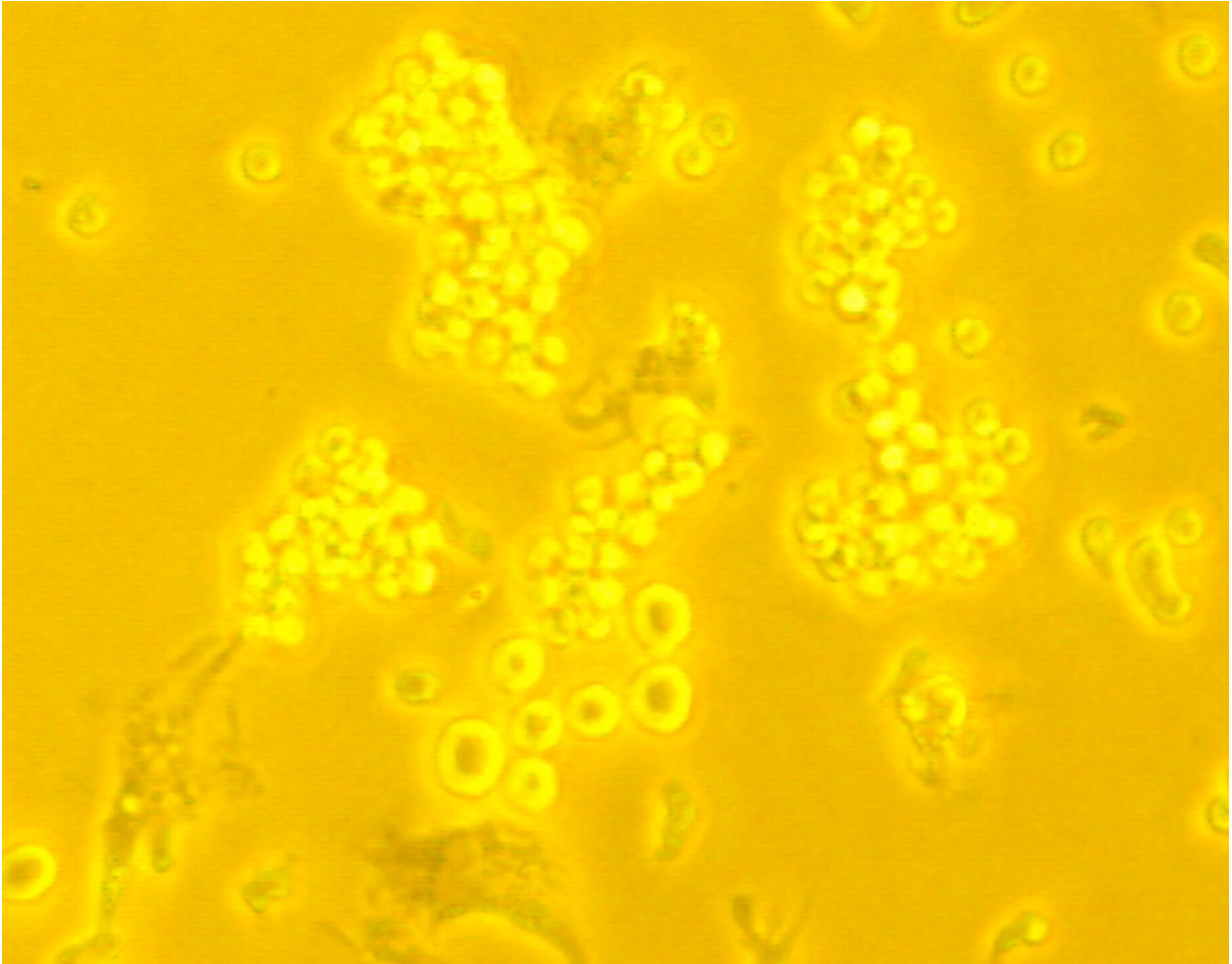
Den Zellsuspensionen für die Ansätze der Antikörper CD34/VEGFR-2 wurde 50 µl humanes Serum für 30 min auf Eis zugesetzt, um vor der spezifischen Antikörperzugabe unspezifische Bindungen zu blockieren. Darauf folgte das Waschen mit FACS Puffer und Zentrifugation über 10 min bei 1300 rpm und 4°C. Dieser Zwischenschritt erfolgte nach jeder weiteren Antikörperapplikation. Zur zusätzlichen Blockung ließ man den Ansatz 10 min mit Ziegenserum auf Eis inkubieren. Dann applizierte man VEGFR-2 (R&D Systems) und ließ den Antikörper nochmals für 20 min auf Eis inkubieren. Als nächstes wurde die Fluoreszenz beigefügt in Form von 1:10 mit FACS- Puffer verdünntem Streptavidin-PE (R&D Systems), welches über 30 min auf Eis im Dunkeln inkubierte. Der Primärantikörper (VEGFR-2) ist über den Sekundärantikörper (Streptavidin-PE), der an den

Primärantikörper bindet, an seine Fluoreszenz gekoppelt. Nach dem Waschen wurde Antikörper CD34FITC für 20 min auf Eis unter Lichtausschluss inkubiert. Danach folgte wiederum eine Auswaschphase. Im Anschluss resuspendierte man die Zellen in jeweils 200 µl FACS Puffer und 200 µl PFA 2%, danach folgte die Messung per FACS-Analyse. Die Fluoreszenzen wurden direkt nach dem Färben mit FACSCalibur (Becton Dickinson) gemessen und mit der Cellquest Software (Becton Dickinson) analysiert. Bei jedem Ansatz wurden 100.000 Ereignisse analysiert.

### **3.3.4 Colony forming units (CFU)**

Die Potenz kultivierter endothelialer Progenitorzellen in der Zellkultur Kolonien zu bilden (colony forming units) ist ein gut charakterisierter Parameter ihrer funktionellen Kapazität. Für die Isolation der Progenitorzellen wurden 20 ml Citratblut benutzt. Die Blutproben wurden auf Eis gelagert und innerhalb von 2 Stunden verarbeitet. Die mononukleären Zellen wurden nach dem Dichtegradienten aufgeteilt. Die isolierten Zellen wurden in Nährlösung (EBM) resuspendiert, und auf eine fibronectinbeschichtete 6er Lochplatte aufgetragen. Um der Möglichkeit der Kontamination des Assays mit reifen endothelialen Progenitorzellen entgegen zu wirken, wurde der Boden der Lochplatte mit Fibronectin beschichtet. Bei jedem Ansatz wurden  $5 \times 10^6$  Zellen ausgesät. Die Zellen wurden anschließend für 48 Stunden im Inkubator bei 37°C kultiviert. Die nichtadherenten Zellen wurden kollektiviert und 1 Million wurden für eine weitere, einwöchige Wachstumsperiode auf eine fibronectinbeschichtete 24er Lochplatte aufgebracht. Nährmedium wurde alle drei Tage gewechselt. Die Kolonien wurden sieben Tage nach dem letzten Auftragen unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Eine Kolonie von endothelialen Progenitorzellen beinhaltet multiple flache, dünne Zellen mit einem zentralen Cluster von runden Zellen. Der Cluster alleine, ohne umliegende Zellen, wurde nicht als Kolonie gezählt. Die Zellen wurden manuell auf mehreren Lochplatten ausgezählt.

## Abbildung 10



*Repräsentatives Beispiel für die aus endothelialen Progenitorzellen kultivierten Kolonien (colony forming units) unter der Therapie mit 80 mg Telmisartan.*

### **3.4 Statistische Analyse**

Die angegebenen Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung des Mittelwertes (SEM) angegeben. Die statistische Signifikanz wurde mit einem ANOVA-Test und dem Newmann-Keuls-Test als multipler Mittelwertvergleichstest, bei Erhalt signifikanter Ergebnisse, untersucht. Die Nullhypothese wurde für  $p < 0.05$  abgelehnt und das Ergebnis als signifikant angenommen. Die statistische Auswertung der Daten, sowie die Erstellung der Säulendiagramme wurde mit der Software Microsoft® Excel 2002 und SPSS durchgeführt.

### **3.5 Materialien**

#### **3.5.1 Verwendete Substanzen**

- Natriumchlorid, Roth, Karlsruhe
- Kaliumchlorid, Roth, Karlsruhe
- di-Natriumhydrogenphosphat, Merck, Darmstadt
- Kaliumdihydrogenphosphat, Merck, Darmstadt
- Albumin bovine Fraktion V (BSA), Serva, Heidelberg
- Aprotinin, Sigma, Deisenhofen
- Hepes, Sigma, Deisenhofen
- Calciumchlorid, Sigma, Deisenhofen
- Ampuva, Fresenius, Bad Homburg
- Goat Serum
- Paraformaldehyd 2%
- Cell Wash, BD, Heidelberg
- FACS-Flow, BD, Heidelberg
- Bicol Separating, Biochrom
- EBM, Cambrex, Walkersville USA
- Fibronectin, Sigma, Deisenhofen
- Lo12
- Angiotensin II
- Turks-Lösung, Merck, Darmstadt

### 3.5.2 Verwendete Puffer

PBS (phosphat buffered solution)	1x PBS 137 mmol/l NaCl 2,7 mmol/l KCl 8,1 mmol/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,5 mmol/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
FACS-Puffer	1x PBS, 4C°, Bovines Serumalbumin 0,1% (BSA), Aprotinin (20 µl/ml)
EBM	Endothelzellmedium supplimentiert mit: 10 µg/ml hEGF epidermaler Wachstumsfaktor , 30 µg/ml GA-1000 Gentamicin Sulfat, 50µg/ml Amphotericin B, 3µg/ml bovines Gehirnextrakt Proteingehalt, 1µg/ml Hydrocortison und 20% fötales Kälberserum, steril

Tabelle 1: Verwendete Puffer

Es kam ausschließlich deionisiertes und bidestilliertes Wasser (Ampuva) zur Verwendung. Zur Zellkulturverwendung wurde dieses Wasser zusätzlich noch autoklaviert.

### 3.5.3 Antikörper für FACS-Analyse

Antikörper-bezeichnung	Fluoreszenz	Herstellung (Tier)	Ig-Fraktion	Herstellerfirma
CD 34 monoklonaler anti-humaner Antikörper, Klon 581	FITC	Maus	IgG1, κ	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
CD 31	PE	Maus	gG2b, κ	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
CD 133/2 monoklonaler anti-humaner Antikörper, Klon 293C3	PE	Maus	IgG2b	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
FLK/KDR/VEGFR2 Ab-1, polyklonaler-anti-humaner Antikörper	Über Sekundär-antikörper	Ziege	polyklonal	R&D Systems, Minneapolis, USA

Tabelle 2: Verwendete Primärantikörper für FACS

Antikörper-bezeichnung	Herstellung (Tier)	Konjugation	Herstellerfirma
Anti-Ziege Streptavidin-R-phycoerythrin	Ziege	PE	R&D Systems, Wiesbaden

Tabelle 3: Verwendeter Sekundärantikörper für FACS

Antikörper-bezeichnung	Fluoreszenz	bindet an	Herstellung (Tier)	Ig-Fraktion	Herstellerfirma
FITC	FITC	Un-spezifisch	Maus	IgG2a	BD Biosciences, Pharmingen Heidelberg
PE	PE	Un-spezifisch	Maus	IgG1, κ	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg

Tabelle 4: Verwendete Isotypenkontrollen für FACS

### **3.5.4 Weitere Antikörper**

- Annexin V Fict, BD, Heidelberg

### **3.5.5 Weitere Materialien**

- Facscalibur, BD, Heidelberg
- Hukasson Cuff Inflator
- Schallkopf 10 Mhz
- Echogerät (Vingmed System Five, Gerneral Electrics Medical Systems)
- Unterarmschiene
- 24 Lochplatten, Greiner, Frickenhausen
- BD Cellquest Software™ Pro Version 4.0.2
- FACS Gerät, BD Becton Dickinson, Heidelberg
- FACS Röhrchen, BD Becton Dickinson, Heidelberg
- Lucia Measurement Software Version 4.81, LIM, Prag
- Microsoft® Excel Software 2002
- Na-Citrat Röhrchen (S-Monovette), Sarstedt, Nümbrecht
- Nitro Kapseln 0,8mg, Pohl Boskamp, Hohenlockstedt



## 4. Ergebnisse

### 4.1 Lipidstudie

Sechs gesunde Probanden wurden für 7 Tage entweder mit 80 mg Atorvastatin oder 10 mg Ezetimib oder mit der Kombination 10 mg Atorvastatin und 10 mg Ezetimib in einer doppelblinden, Crossoverstudie behandelt. Jeder Behandlungsperiode war eine Auswaschphase von 7 Tagen vorgeschaltet. Die zugrunde liegenden Probandencharakteristika sind in folgender Tabelle beschrieben:

Abbildung 11

<b>PATIENTEN CHARAKTERISTIKA</b>		<b>mean</b>	<b>SEM</b>
<b>Anzahl</b>		6	
<b>Alter</b>	(Jahre)	31,3	4,1
<b>Gewicht</b>	(kg)	75	7,5
<b>Größe</b>	(cm)	179	10
<b>RR systolisch</b>	(mmHg)	123	7,2
<b>RR diastolisch</b>	(mmHg)	79	5,6
<b>HR</b>	(beats/min)	55	9
<b>Hb</b>	(g/dl)	15,0	0,6
<b>Hkt</b>	(%)	42,5	1,8
<b>Erythrozyten</b>	(mill/ $\mu$ l)	4,7	0,2
<b>Leukozyten</b>	(cells/ $\mu$ l)	6250	1470
<b>Thrombozyten</b>	(cells/ $\mu$ l)	217000	32700
<b>Kalium</b>	(mmol/l)	4,0	0,2
<b>Natrium</b>	(mmol/l)	139	3,7
<b>Kreatinin</b>	(mg/dl)	0,9	0,1
<b>GPT</b>	(U/l)	30	12,1
<b>CK</b>	(U/l)	113	59
<b>Glucose</b>	(mg/dl)	77,8	23,3

#### 4.1.1 Auswirkung von Atorvastatin 80 mg und Ezetimib 10 mg und Atorvastatin 10 mg + Ezetimib 10 mg auf die Cholesterinabsorption, Synthese und Plasmacholesterinkonzentration

Atorvastatin 80 mg/d reduziert das LDL-Cholesterin um 41,5%, Ezetimib 10 mg/d um 11,8%, die Kombinationsbehandlung aus beiden um 47,7%. Die Cholesterinbiosynthese, als Verhältnis von Lathosterin zu Cholesterin berechnet, wurde von Atorvastatin um 73% gesenkt, stieg unter Ezetimib auf 54% an, und wurde von beiden Präparaten in Kombination um 25% gesenkt. Die Cholesterinabsorption, gemessen an der Campesterin- und Sitosterinplasmakonzentration, wurde durch Ezetimib und die Kombination reduziert, blieb jedoch unbeteiligt bei der Statin-Monotherapie. Details sind in den folgenden Tabellen gezeigt.

**Abbildung 12**

LIPID-PARAMETER	pre	post			pre	post		
	Gesamt Cholesterin		% Änderung	p	LDL Cholesterin		% Änderung	p
	(mg/dl)				(mg/dl)			
<b>Atorvastatin 80</b>	<b>155,8</b>	<b>117,8</b>	<b>-24,4</b>	<b>0,003</b>	<b>91,5</b>	<b>53,5</b>	<b>-41,5</b>	<b>0,003</b>
SEM	4,4	4,9			5,9	6		
<b>Ezetimibe 10</b>	<b>144,3</b>	<b>135,5</b>	<b>-6,1</b>	<b>0,130</b>	<b>75,3</b>	<b>66,4</b>	<b>-11,8</b>	<b>0,035</b>
SEM	4,3	8,2			6,4	7,5		
<b>Atorvastatin 80 + Ezetimibe 10</b>	<b>151,4</b>	<b>110,8</b>	<b>-26,8</b>	<b>0,01</b>	<b>86</b>	<b>45</b>	<b>47,7</b>	<b>0,003</b>
SEM	8,7	3,8			7,4	4,8		
	<b>HDL Cholesterin</b>				<b>Triglyceride</b>			
	(mg/dl)				(mg/dl)			
<b>Atorvastatin 80</b>	<b>47,7</b>	<b>51,4</b>	<b>7,8</b>	<b>0,021</b>	<b>90,6</b>	<b>76,2</b>	<b>-15,9</b>	<b>0,243</b>
SEM	4	3,9			12,9	7,4		
<b>Ezetimibe 10</b>	<b>53,1</b>	<b>51,2</b>	<b>-3,6</b>	<b>0,424</b>	<b>99,3</b>	<b>118,5</b>	<b>19,3</b>	<b>0,247</b>
SEM	2,5	2,9			12,8	16,6		
<b>Atorvastatin 80 + Ezetimibe 10</b>	<b>50,1</b>	<b>56</b>	<b>11,8</b>	<b>0,05</b>	<b>81,2</b>	<b>55,8</b>	<b>-30</b>	<b>0,05</b>
SEM	2,7	2,8			9	4,4		

*Lipidparameter vor und nach Gabe von Atorvastatin 80 mg, Ezetimib 10 mg, und Kombination von Atorvastatin 80 mg und Ezetimib 10 mg.*

**Abbildung 13**

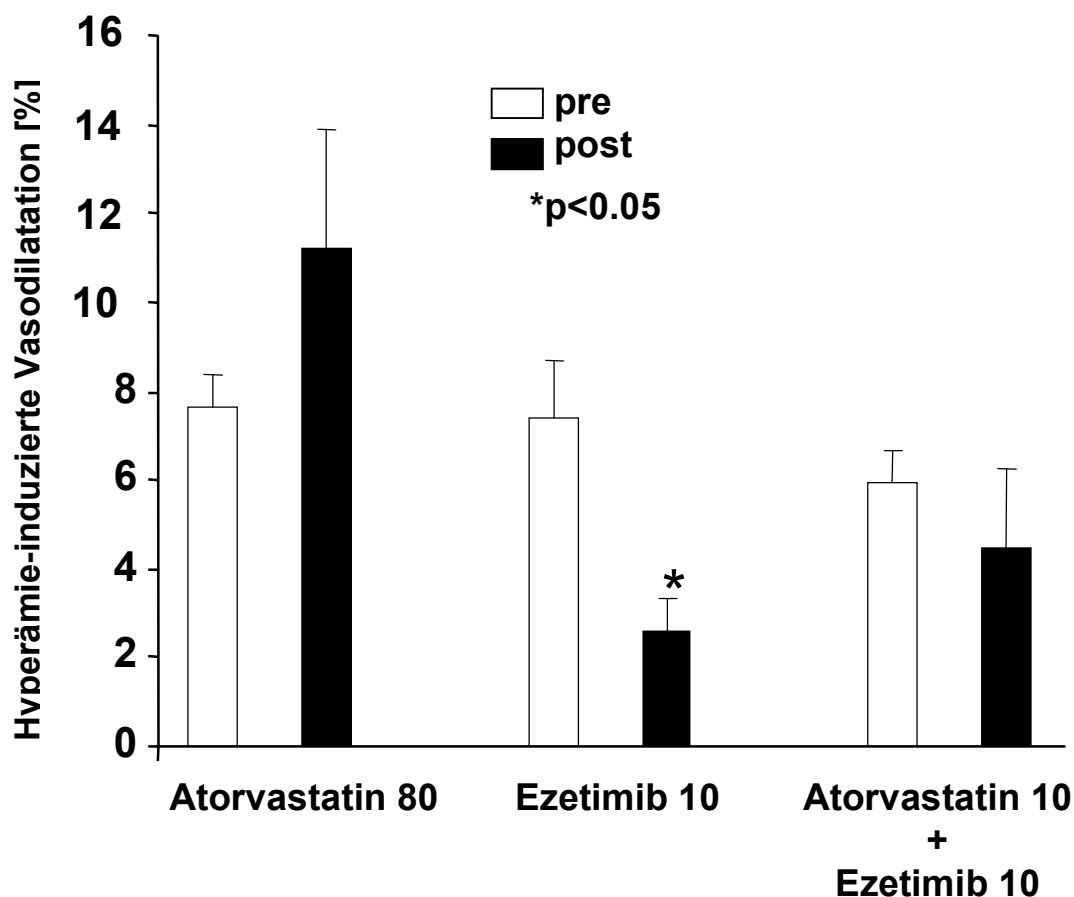
LIPID- PARAMETER	pre	post			pre	post		
			% Änderung	p			% Änderung	p
	<b>Lathosterin</b>				<b>Lathosterin</b>			
	(µl/mg)				Ratio/Chol.			
<b>Atorvastatin 80</b>	<b>0,29</b>	<b>0,06</b>	<b>-79,3</b>	<b>0,004</b>	<b>0,15</b>	<b>0,04</b>	<b>-73,3</b>	<b>0,004</b>
SEM	0,05	0,05			0,02	0		
<b>Ezetimibe 10</b>	<b>0,24</b>	<b>0,28</b>	<b>16,7</b>	<b>0,002</b>	<b>0,11</b>	<b>0,17</b>	<b>54,5</b>	<b>0,019</b>
SEM	0,03	0,03			0,01	0,02		
<b>Atorvastatin 80 + Ezetimibe 10</b>	<b>0,24</b>	<b>0,13</b>	<b>-45,8</b>	<b>0,01</b>	<b>0,12</b>	<b>0,09</b>	<b>-25</b>	<b>0,005</b>
SEM	0,03	0,02			0,01	0,01		
	<b>Campesterin</b>				<b>Sitosterin</b>			
	(µl/mg)				(µl/mg)			
<b>Atorvastatin 80</b>	<b>0,3</b>	<b>0,31</b>	<b>3,3</b>	<b>0,39</b>	<b>0,22</b>	<b>0,24</b>	<b>9,1</b>	<b>0,176</b>
SEM	0,1	0,06			0,06	0,04		
<b>Ezetimibe 10</b>	<b>0,24</b>	<b>0,16</b>	<b>-33,3</b>	<b>0,034</b>	<b>0,19</b>	<b>0,13</b>	<b>-31,6</b>	<b>0,05</b>
SEM	0,03	0,06			0,02	0,01		
<b>Atorvastatin 80 + Ezetimibe 10</b>	<b>0,3</b>	<b>0,19</b>	<b>-36,7</b>	<b>0,07</b>	<b>0,22</b>	<b>0,17</b>	<b>-22,7</b>	<b>0,025</b>
SEM	0,07	0,05			0,05	0,04		
	<b>Campesterin</b>				<b>Sitosterin</b>			
	Ratio/Chol.				Ratio/Chol.			
<b>Atorvastatin 80</b>	<b>0,14</b>	<b>0,21</b>	<b>50</b>	<b>0,002</b>	<b>0,11</b>	<b>0,16</b>	<b>45,5</b>	<b>0,005</b>
SEM	0,04	0,04			0,02	0,03		
<b>Ezetimibe 10</b>	<b>0,13</b>	<b>0,1</b>	<b>-23,1</b>	<b>0,05</b>	<b>0,1</b>	<b>0,1</b>	<b>0</b>	<b>0,122</b>
SEM	0,03	0,01			0,02	0,02		
<b>Atorvastatin 80 + Ezetimibe 10</b>	<b>0,16</b>	<b>0,13</b>	<b>18,8</b>	<b>0,008</b>	<b>0,12</b>	<b>0,12</b>	<b>0</b>	<b>0,11</b>
SEM	0,05	0,03			0,03	0,02		

*Die Cholesterinbiosynthese wird als Verhältnis von Lathosterin zu Cholesterin berechnet. Atorvastatin senkt die Biosynthese um 73%, Ezetimib steigert die Synthese um 54 %. Die Cholesterinabsorption, gemessen an der Serumkonzentration von Campesterin und Sitosterin sank unter Ezetimib und blieb unbeeinflusst durch die Statinmonotherapie.*

#### 4.1.2 Differentieller Einfluss von Atorvastatin 80 mg und Ezetimib 10 mg und Atorvastatin 10 mg + Ezetimib 10 mg auf den Hyperämie-induzierten Blutfluss im Unterarm

Die Endothelfunktion wurde wie oben beschrieben, durch sonographische flussabhängige Dilatation der Armarterie vor und nach der Behandlungsperiode gemessen. Die Endothelfunktion wurde nur durch Behandlung mit einer hohen Dosis Statin verbessert  $3,6 \pm 3,4\%$ . Ezetimib hingegen verschlechterte die Endothelfunktion  $5,8 \pm 0,9\%$ ,  $p < 0,05$ , die Kombination aus beiden Medikamenten zeigte keinen Effekt  $1,4 \pm 3,4\%$ .

Abbildung 14

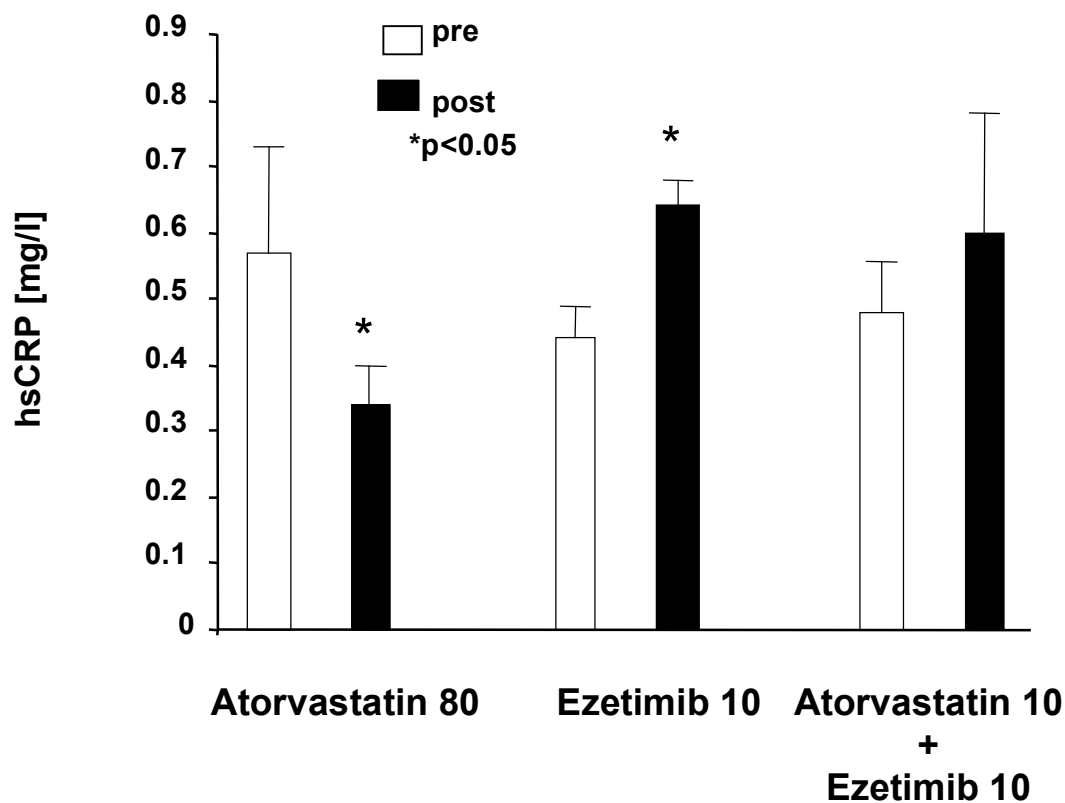


*Differentieller Einfluss von Atorvastatin 80 mg, Ezetimib 10 mg oder der Kombination von Atorvastatin 80 mg und Ezetimib 10 mg auf den Hyperämie-induzierten Blutfluss der A. brachialis nach einer Woche.*

#### 4.1.3 hsCRP unter der Behandlung mit Atorvastatin 80 mg und Ezetimib 10 mg und Atorvastatin 10 mg + Ezetimib 10 mg

Um die Effekte der Lipidsenkung auf die vaskuläre Inflammation zu dokumentieren, wurde hsCRP bestimmt. Dabei konnte festgestellt werden, dass Atorvastatin 80 mg das hsCRP senkte, während Ezetimib 10 mg als Monotherapie zum Anstieg des hsCRP führte, während die Kombination aus beiden Medikamenten das hsCPR nicht ändert (nichtsignifikanter Trend zur Hochregulation).

**Abbildung 15**



*Änderung des hoch sensitiven CRP unter der 7 täglichen Therapie mit Atorvastatin 80 mg, Ezetimib 10 mg und der Kombination von Atorvastatin 80 mg und Ezetimib 10 mg.*

## 4.2 RAAS-Studie

36 Patienten mit angiographisch gesicherter, klinisch stabiler koronarer Herzkrankheit wurden doppelblind und prospektiv in drei Behandlungsarme randomisiert: AT1-Antagonist Telmisartan 80 mg/d, ACE-Hemmer Ramipril 10 mg/d und Placebo. Die Gabe der Studienmedikation erfolgte für 3 Monate zusätzlich zu einer etablierten, leitliniengerechten medikamentösen Behandlung der KHK mit ASS, Statinen und  $\beta$ -Blocker, die während der Studiendauer nicht modifiziert wurde. Die basierenden Patientencharakteristika sind in folgender Tabelle dargestellt.

Abbildung 16

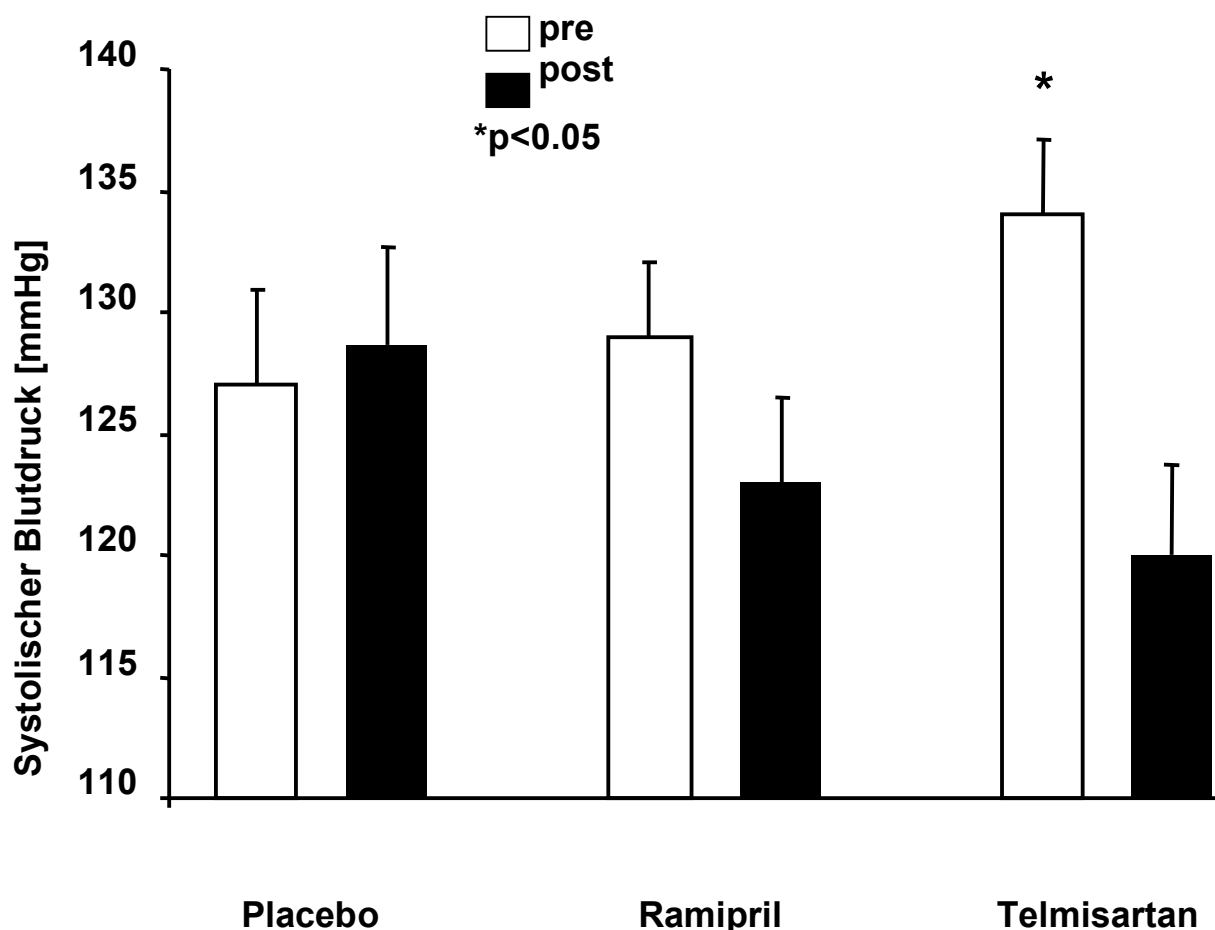
PATIENTEN-CHARAKTERISTIKA		Placebo		Ramipril		Telmisartan		
		mean	SEM	mean	SEM	mean	SEM	p
Anzahl		12		12		12		
Alter	(Jahre)	60	2	56	3	56	2	0,112
Gewicht	(kg)	75	3	88	3	84	5	0,01
Größe	(cm)	170	2	173	2	173	2	0,111
BMI	(kg/m <sup>2</sup> )	26	1	29	1	28	2	0,032
Herzfrequenz	(/min)	63	4	64		67	2	0,205
Cholesterin	(mg/dl)	189	9	171	11	192	15	0,264
HDL	(mg/dl)	62	4	47	3	47	4	0,001
LDL	(mg/dl)	104	12	95	10	117	12	0,489
Triglyceride	(mg/dl)	174	50	184	27	188	52	0,408
MEDIKATION								
$\beta$ -Blocker	(%)	100		100		91		
ASS	(%)	100		100		100		
Statin	(%)	100		92		100		
Diuretika	(%)	17		25		18		

*Charakteristika der an der RAAS-Studie teilgenommenen Patienten. Die kardioprotektive Therapie der koronaren Herzkrankheit wurde von dieser Studie nicht berührt.*

#### 4.2.1 Effekte von Ramipril 10 mg und Telmisartan 80 mg auf den systolischen Blutdruck

Die Blutdruckmessung erfolgte jeweils nach 30 min im Liegen nach Riva-Rocci am Oberarm. Die erste Messung erfolgt bei der ersten Ultraschalluntersuchung der Arteria brachialis, die zweite Messung bei der Abschlussuntersuchung nach drei Monaten. Der Effekt auf den systolischen Blutdruck des Ausgangswertes betrug unter Telmisartan -10% ( $p<0.05$ ), unter Ramipril -4,5% (n.s.) und unter Placebo +1,6% (n.s.).

Abbildung 17



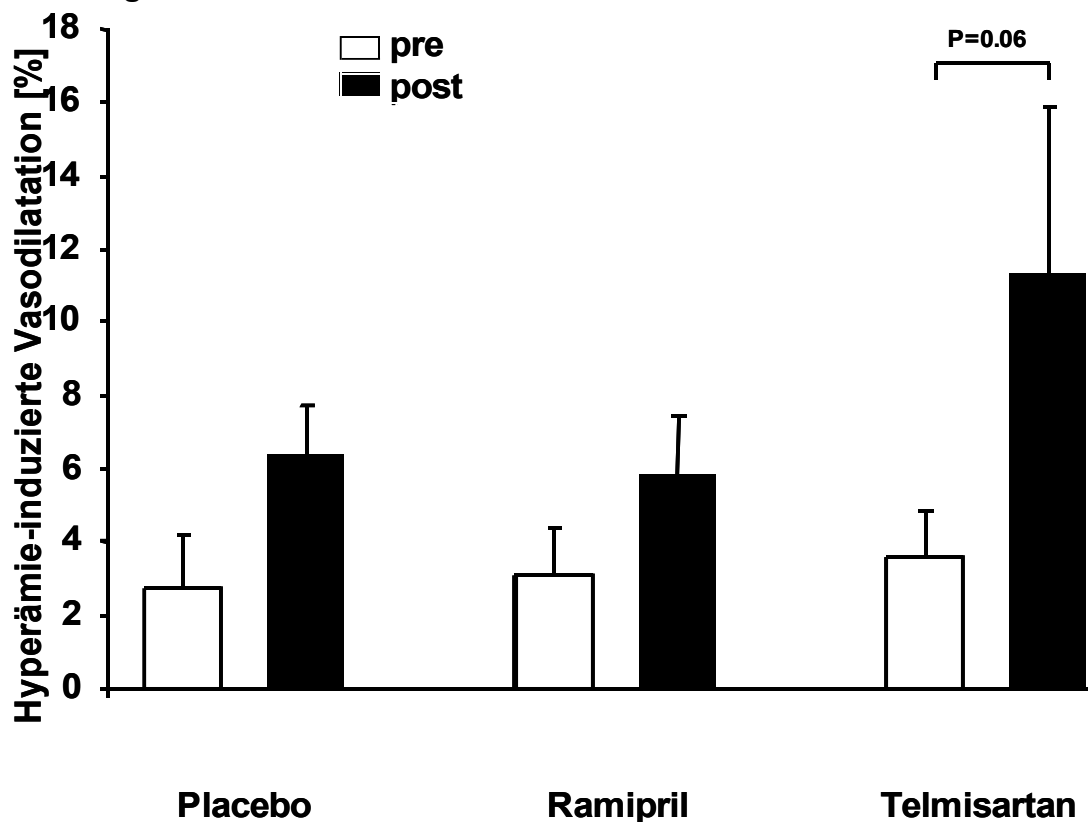
*Änderung des systolischen Blutdrucks vor und nach Gabe von Placebo oder 10 mg Ramipril oder 80 mg Telmisartan im Zeitraum von 3 Monaten. Telmisartan senkt den Blutdruck um 10%, Ramipril um 4,5%, Placebo erhöht um 1,6%.*

#### 4.2.2 Differentieller Einfluss von Ramipril 10 mg und Telmisartan 80 mg auf den Hyperämie-induzierten Blutfluss im Unterarm

Um zu untersuchen, ob es einen differentiellen Einfluss von Ramipril gegenüber Telmisartan gibt, wurden eine ultraschallbasierte Endothelfunktionsmessung der A. brachialis vor und nach der Behandlungsphase mit der Studienmedikation durchgeführt. Die sonographische Bestimmung der endothelunabhängigen Vasodilatation der A. brachialis links bei Nitroglycerin Gabe, zeigte keine Veränderung und wurde somit durch die Studienmedikation nicht beeinflusst.

Die endothelabhängige Vasodilatation als Marker für die endotheliale Dysfunktion, zeigte unter Telmisartan eine tendenzielle, jedoch nicht signifikante Steigerung (+11%,  $p=0,06$ ), während die Änderung unter Ramipril dem Placebo-Effekt entsprach (+3% bzw. +2,7%).

Abbildung 18



*Differentieller Einfluss von Placebo, 10 mg Ramipril oder 80 mg Telmisartan auf den Hyperämie induzierten Blutfluss der A. brachialis nach 3 Monaten. Steigerung unter Telmisartan von 11%, unter Ramipril von 2,7%, unter Placebo 3%. Die Effekte waren statistisch nicht signifikant.*

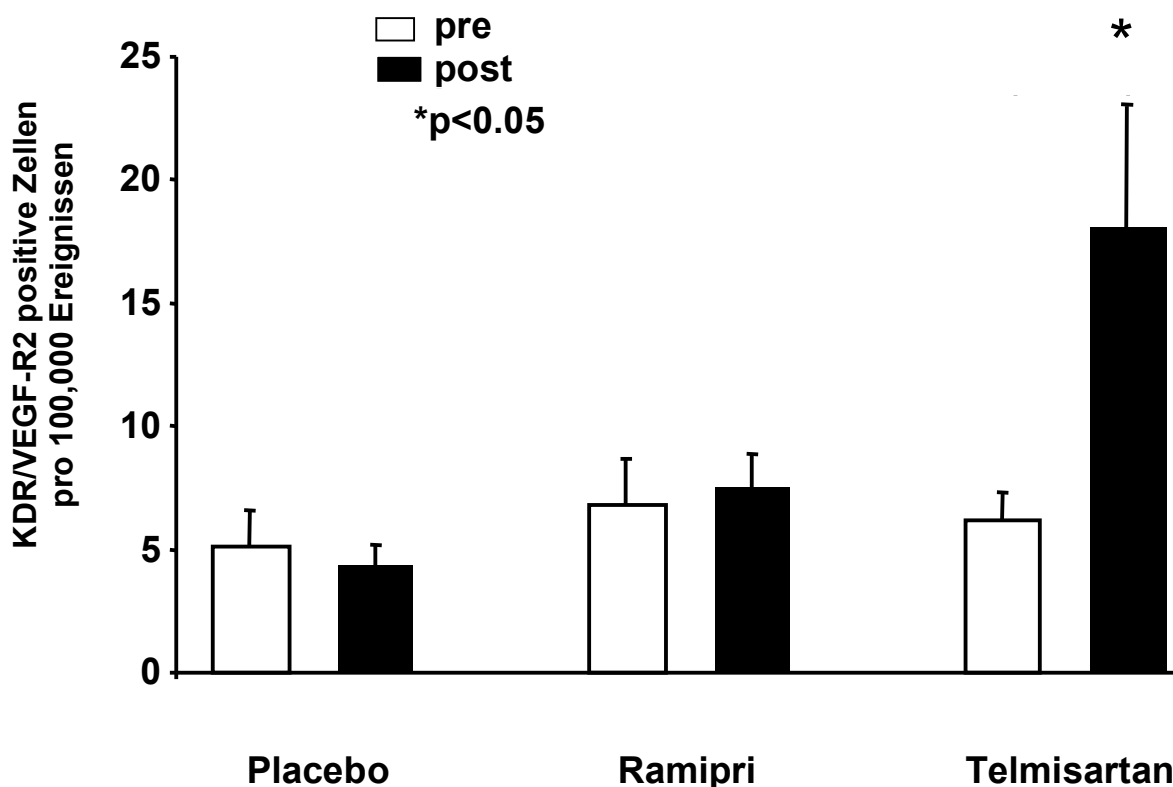


#### 4.2.3 Differentielle Regulation der Anzahl der zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen durch Ramipril 10 mg und Telmisartan 80 mg

Nach Isolation der endothelialen Progenitorzellen aus 20 ml peripherenvenösem Blut und Messung per Durchflusszytometrie, zeigte sich nach Behandlung mit Telmisartan 80 mg/d für 3 Monate eine Steigerung der CD34/VEGFR2 positiven EPC um  $279 \pm 126\%$ ,  $p < 0.05$ . Dagegen zeigte sich kein Unterschied der CD34/VEGFR2 positiven EPC-Zahl nach Behandlung mit Ramipril 10 mg oder Placebo.

Telmisartan 80 mg/d führt somit zu einem steigenden Anteil der zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen gegenüber der Therapie mit Ramipril 10 mg/d.

Abbildung 19



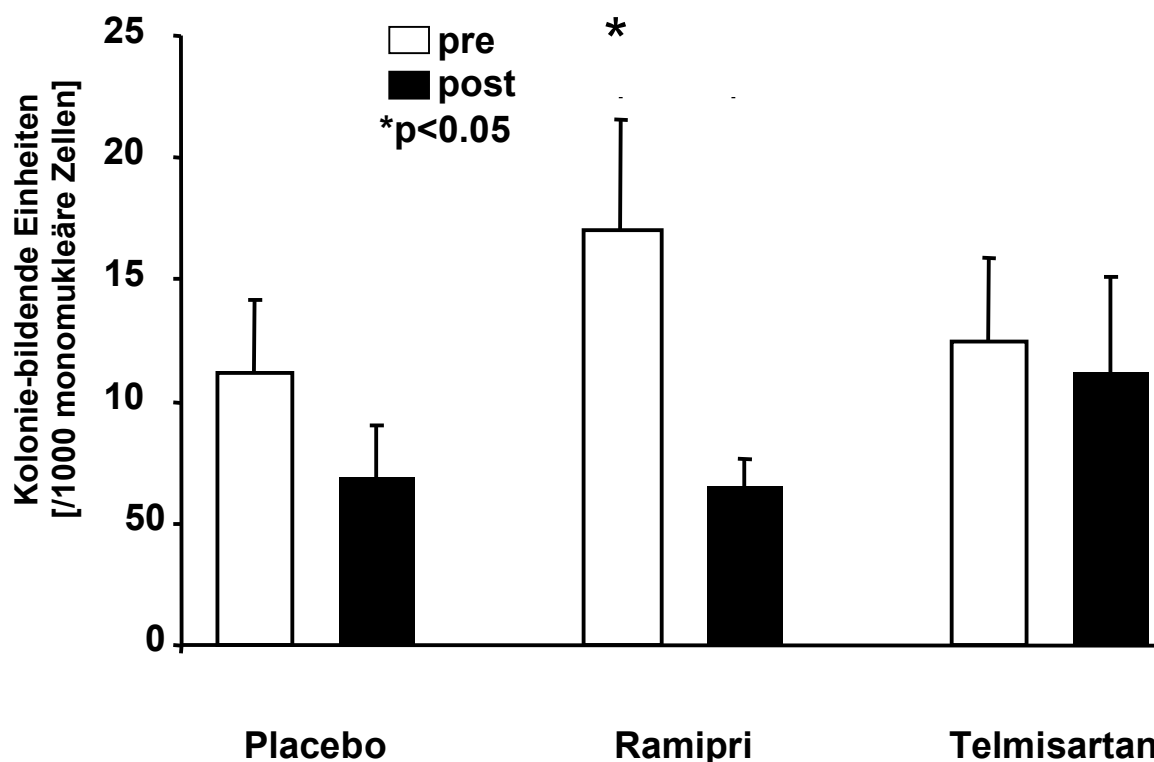
*FACS Analyse der differentiellen Regulation der endothelialen Progenitorzellen (KDR/VEGF-R2 positiven mononukleären Zellen) vor und nach 3 monatiger Behandlung mit Placebo, 10 mg Ramipril oder 80 mg Telmisartan.*

#### 4.2.4 Regulation der colony forming units durch Behandlung mit Ramipril 10 mg oder Telmisartan 80 mg

Die Potenz kultivierter endothelialer Progenitorzellen, in der Zellkultur Kolonien zu bilden (colony forming units), ist ein gut charakterisierter Parameter ihrer funktionellen Kapazität.

Die Behandlung mit Ramipril 10 mg/d führte zu einer Verminderung der replikativen Potenz um  $61 \pm 23\%$ ,  $p < 0.05$ , während Telmisartan 80 mg/d und Placebo keinen Effekt auf die Anzahl der Kolonie-bildenden Einheiten hatten.

Abbildung 20



*Einfluss der 3 monatigen Behandlung mit Placebo, 10 mg Ramipril oder 80 mg Telmisartan auf die Regulation der Kolonie-bildenden Einheiten aus endothelialen Progenitorzellen (colony forming units). Dabei führte Ramipril 10 mg zu einer Verminderung der Kolonie-bildenden Potenz, Telmisartan 80 mg und Placebo führten zu keinem Effekt.*

## 5. Diskussion

### 5.1 Lipidstudie

Die Hauptaussagen dieser klinischen Pilotstudie an 6 gesunden Probanden sind Hinweise auf differentielle vaskuläre Effekte einer Cholesterinsenkung durch Inhibition der HMG CoA-Reduktase verglichen mit einer LDL Senkung durch die Kombination aus Inhibition der intestinalen Cholesterinaufnahme und Statintherapie. Atorvastatin 80 mg/d senkt hsCRP und verbessert die endothelabhängige Vasodilatation, wohingegen Atorvastatin 10 mg/d und Ezetimib 10 mg/d, bei gleicher LDL Serumkonzentration, diese Parameter nicht verändert haben. Im Gegensatz dazu zeigte sich unter Monotherapie mit Ezetimib 10 mg/d ein Trend zur Verschlechterung der Endothelfunktion.

Die Monotherapie mit Statinen senkt das kardiovaskuläre Risiko. Dies wurde bei Patienten mit Hypercholesterinämie und bei Patienten mit normalen Lipidparametern gezeigt. Patienten mit und ohne etablierter Atherosklerose profitieren von einer Statintherapie (*Heart Protection Study Group 2002, Sever et al. 2003*). Weiterhin zeigen Befunde aus der Zellkultur und aus Tierversuchen, dass HMG CoA-Reduktase Hemmer zusätzlich zur Cholesterinsenkung positive Effekte ausüben (*Liao 2004*). Die Hemmung der HMG CoA-Reduktase verringert die Cholesterinbiosynthese und gleichzeitig nehmen die Lipidintermediate dieser Biosynthese ab (*Goldstein und Brown 2000*). Die posttranskriptionelle Isoprenylierung reguliert die intrazelluläre Lokalisation und Funktion von Faktoren, wie z. B. die der kleinen G-Proteine (*Bishop und Hall 2000*). Es ist denkbar, dass Statine zum molekularen Ablauf von Kaskaden führen, deren Effekte unabhängig zur Cholesterinkonzentration sind. Dies umfasst die gesteigerte Expression und Aktivität der NO-Synthase, anti-inflammatorischer Prozesse, weiterhin wird oxidativer Stress über die Reduktion der AT1-Rezeptorexpression und NADPH-Oxidase Aktivität reduziert (*Sever et al. 2003, Wassmann et al. 2001, Laufs und Liao 1998, Landmesser et al. 2005*).

Im Menschen ist die Situation weniger klar, weil lipidabhängige und lipidunabhängige Effekte schwer zu trennen sind. Einige Erkenntnisse deuten darauf hin, konnten aber bisher nicht beweisen, dass lipidunabhängige Effekte von Wichtigkeit sind (*Liao und Laufs 2004, Fichtlscherer et al. 2005*).

Statine verringern das kardiovaskuläre Risiko auch bei Patienten mit niedrigem LDL-Ausgangscholesterin. (*Heart Protection Study Group, 2002*). Die Statineinnahme führt zu vorteilhaften Gefäßeffekten in Stunden oder in Tagen (*Wassmann et al. 2003*). Weiterhin profitieren auch Patienten mit einem Normocholesterin, z.B. Patienten mit dilatativer, nicht-ischämischer Kardiomyopathie, welche nicht in Beziehung zur Atherosklerose steht, von einer Statintherapie (*Laufs et al. 2004, Node et al. 2003*).

Der Cholesterinabsorptionshemmer Ezetimib wurde in dieser Studie als Werkzeug genutzt, um die potentiellen pleiotropen Effekte der Statine zu erforschen. Die Kombination aus 10 mg/d Ezetimib mit 10 mg/d Atorvastatin, führte zu einer ähnlich hohen Cholesterinsenkung, wie bei einer Hochdosisbehandlung von Atorvastatin 80 mg/d. Zur quantitativen Analyse der intestinalen Cholesterinabsorptionshemmung wurden Campesterin und Sitosterin gemessen. Wie erwartet senkte die Kombinationstherapie und Ezetimib alleine, nicht aber Atorvastatin, die Serumkonzentrationen von Campesterin und Sitosterin (*Sudhop et al. 2002*). Das Verhältnis von Lathosterin zu Cholesterin stellt einen Parameter der hepatischen Cholesterinbiosynthese dar. Die Inhibition der intestinalen Cholesterinaufnahme erhöht durch einen Rückkopplungsmechanismus die Cholesterinsynthese (*Sudhop et al. 2002*). Eine einwöchige Behandlung mit Ezetimib 10 mg/d war ausreichend, um die Rate der Umwandlung von Lathosterin zu Cholesterin bei >50% der Probanden zu erhöhen. Atorvastatin reduzierte merklich die Cholesterinsynthese (-79%), dies war teilweise erhalten bei der Behandlung mit der Kombination. Dieser Effekt deutet auf eine differentielle Regulation der Isoprenoidsynthese hin. Ezetimib steigert die Cholesterinbiosynthese und somit auch Farnesylpyrophosphat als Zwischenprodukt. Folge ist eine erhöhte Aktivität der Familie der kleinen G-Proteine wie z.B. Rac 1. Rac1 gehört zur Gruppe der kleinen Rho GTPasen. Diese sind von zentraler Bedeutung bei der Signaltransduktion in der Gefäßwand (*Laufs und Liao 2000*). Rac1 führt zu einer Aktivierung der NADPH-

Oxidase und setzt Sauerstoffradikale in der Gefäßwand frei. Dies ist die Hauptquelle der vaskulären Superoxideproduktion (*Harrison et al. 2003, Bokoch und Diebold 2002*). Die Aktivität der Rac1-GTPase hat sich in vorhergehenden Studien als abhängig von der Isoprenylierung gezeigt (*Bishop und Hall 2000*). Die Rac1 Aktivität ist ein potentieller Effektor der differentiellen Regulation der Cholesterinsynthese. Reduzierter oxidativer Stress führt zu einer Verbesserung der Endothelfunktion (*Harrison et al. 2003*). Atorvastatin 80 mg/d verminderte in unserer Studie die Rac1-Aktivität. In Übereinstimmung mit der Hypothese der differentiellen Regulation der kleinen G-Proteine zeigte sich weiterhin eine Verbesserung der Endothelfunktion.

Die Ezetimib Monotherapie reduzierte das LDL-Cholesterin um nur 12%. Die Kurzzeitbehandlung neigte zur Verschlechterung aller aufgenommenen Parameter und beeinträchtigte die Endothelfunktion, sodass geprüft werden muss, ob andere Prozesse in Zusammenhang mit der LDL-Verminderung zur Atheroprotektion führen. Die Verbesserung bzw. die Tendenz zur Verschlechterung der Endothelfunktion konnte in weiteren klinischen Studien mit Kurzzeitbehandlungen von Statinen und Ezetimib gezeigt werden (Landmesser 2005, Fichtlscherer 2006).

Limitierung der Studie: Diese Studie baut auf einer Kurzzeitbehandlung von gesunden Probanden auf. Es besteht die Möglichkeit, dass in Langzeitstudien sich die Unterschiede zwischen einer Hochdosistherapie mit Statinen und einer Kombinationstherapie mit Ezetimib und Niedrigdosistherapie mit Statinen, angleichen. Ein reproduzierbarer Effekt der Kombinationstherapie auf klinische Endpunkte muss in separaten Studien gezeigt werden. Weiterhin besteht der Bedarf für Endpunktstudien mit Ezetimib als Monotherapie. Es ist möglich, dass nur die Statine für die beobachteten, vorteilhaften Effekte verantwortlich sind, besonders in Abwesenheit der differentiellen Cholesterinsenkung. Diese Daten weisen auf eine Existenz von cholesterinunabhängigen Effekten in Menschen hin. Des Weiteren zeigt sich in dieser Studie ein möglicher differentieller Effekt von Hemmern der HMG CoA-Reduktase, im Vergleich zur Hemmung der Cholesterinaufnahme auf die Endothelfunktion. Das Konzept der Statintherapie bei kardiovaskulärem Risiko und nicht nur bei erhöhtem Serumcholesterin alleine wird somit bestätigt.

## 5.2 RAAS-Studie

Der zentrale Befund der vorliegenden Arbeit sind Hinweise auf eine differentielle Regulation der zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen und der Endothelfunktion durch die Behandlung mit dem AT1-Antagonisten Telmisartan 80 mg/d und dem ACE-Hemmer Ramipril 10 mg/d. Die Aussagekraft der Untersuchung ist durch die kleine Fallzahl limitiert. Die Befunde müssen in größeren Patientenkollektiven bestätigt werden. Die endotheliale Funktion wird u.a. durch das Verhältnis der Auswirkung einer Schädigung und der Reparationskapazität des Körpers bestimmt. Studien zeigen, dass kardiovaskuläre Risiken mit fortschreitendem Verlust der Endothelfunktion und der Reparationsmechanismen einhergehen (*Schmidt-Lucke et al. 2005, Fadini et al. 2006*). Dabei ist noch wenig bekannt, welche Mechanismen für die Gefäßfunktionserhaltung eine Rolle spielen. Wir und andere Arbeitsgruppen postulieren, dass zirkulierende endotheliale Progenitorzellen einen Aspekt dieses Mechanismus darstellen. Die Anzahl der endothelialen Progenitorzellen und die Gefäßfunktion, gemessen an der reaktiven, hyperämischen Vasodilatation bei Probanden ohne bisheriges kardiovaskuläres Ereignis, sinkt mit der Zunahme kardiovaskulärer Risikofaktoren (*Hill et al. 2003*). Weiterhin bedingt die Anzahl der CD34/KDR positiven Zellen das Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen (*Werner et al. 2005*). Kardiovaskuläre Risikofaktoren führen zu erhöhtem oxidativem Stress, NO-Oxidase Aktivitätserhöhung und anderen pathologischen, inflammatorischen Prozessen. Diese können sich direkt auf die Zirkulation und Mobilisation der Progenitorzellen auswirken. Risikofaktoren wie eine positive Familienanamnese, arterielle Hypertension und Rauchen sind mit einem signifikanten Abfall der CD34/KDR positiven Zellen *assoziiert* (*Vasa et al. 2001*). Der Pool der endothelialen Progenitorzellen scheint mit den koronaren Risikofaktoren in Relation zu stehen. So zeigen Patienten mit koronarer Herzkrankheit ein beschädigtes Migrationsvermögen der Vorläuferzellen, welches invers zur Anzahl der Risikofaktoren korreliert (*Vasa et al. 2001*). Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen steht die Erkenntnis, dass unter Therapie mit einem HMG-CoA Inhibitor die Anzahl der Progenitorzellen steigen und sich die Endothelfunktion verbessert (*Llavadot, Murasawa, Kureishi et al. 2001, Dimmeler, Aicher, Vasa et al. 2001, Vasa, Fichtschere, Adler et al. 2001, Laufs et al. 2004*).

Die Hemmung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems durch ACE-Hemmer oder AT1-Rezeptorantagonisten ist eine wichtige Therapiestrategie bei der Behandlung der arteriellen Hypertonie und seiner kardiovaskulären Komplikationen wie Schlaganfall, Myokardinfarkt und Herzinsuffizienz. Experimentelle Studien zur Pathophysiologie kardiovaskulärer Erkrankungen weisen darauf hin, dass die Inhibition des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems über die Blutdrucksenkung hinaus positive Effekte auf das kardiovaskuläre System hat (*Nickenig und Harrison 2002, Lucius et al. 1999*). Im Tierexperiment konnten Wassmann et al. eine Zunahme von atherosklerotischen Läsionen und eine Verschlechterung der Endothelfunktion bei ApoE-knockout Mäusen unter hochcholesterinreichem Futter zeigen. Eine Verschlechterung des Gefäßzustandes zeigte sich bei ApoE/AT1-knockout Tieren nicht. Diese Resultate weisen auf die Bedeutung des AT1 Rezeptors bei der Entstehung der Atherosklerose hin (*Wassmann et al. 2005*).

Große klinische Studien, die den Einfluss einer Renin-Angiotensin-System-Inhibition bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen untersucht haben, zeigten positive Effekte auf die Gefäßfunktion. In der HOPE Studie (Heart Outcomes Prevention Evaluation study) zeigte sich, dass der ACE-Hemmer Ramipril bei Hochrisikopatienten das relative Risiko eines primären kardiovaskulären Ereignisses um 22% reduziert (*Yusuf et al. 2000*). Weitere Studien wie CONSENSUS (Results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study), (*The CONSENSUS Trial Study Group, 1989*) und die EUROPA Studie (European trial On reduction of cardiac events with Perindopril in stable coronary Artery disease Investigators), (*Fox et al. 2003*), konnten ähnliche Effekte nachweisen. ACE-Hemmer und AT1-Rezeptorblocker spielen somit eine wichtige Rolle bei der Therapie der Atherosklerose.

Gegenstand intensiver Forschung ist derzeit die Interaktion von Angiotensin II mit Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen, sowie der Einfluss auf die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, Chemokine, Adhäsionsmoleküle und Lipide (*Nickenig et al. 2002, Ferrario und Flack 1996, Keidar 1998*).

In Vorstudien wurde gezeigt, dass der systolische Blutdruck negativ mit der Anzahl von CD34 und KDR positiven Zellen im peripheren Blut korreliert (*Werner N. 2006, Vasa M. et al 2006*). In Übereinstimmung zeigte sich in unserer Studie eine stärkere Zunahme der endothelialen Progenitorzellen in Form von CD34 und KDR positiven Zellen unter der Medikation mit Telmisartan 80mg/d. Der Zunahme der Zellen um  $279 \pm 126\%$  steht eine Senkung des systolischen Blutdrucks um 10 % gegenüber ( $p < 0,05$ ). Unter Therapie mit Ramipril zeigte sich bei einer Senkung des systolischen Blutdrucks um 4,5% nur eine geringfügige Steigung der EPC. Weitergehend zeigte Bahlmann, dass der positive Effekt von AT1 Rezeptorblockern auf die Progenitorzellen unabhängig von der Blutdrucksenkung bei Patienten mit Diabetes mellitus ist und bestätigte, dass es dabei zu einem Anstieg der Progenitorzellen kommt. Dies wurde mit zwei verschiedenen AT1 Blockern gezeigt. Im Gegensatz dazu konnte der Autor bei Patienten, die mit einer standardisierten antihypertensiven Therapie behandelt wurden, keine Effekte auf die EPC finden (*Bahlmann 2005*). In unserer Studie zeigt sich in Übereinstimmung damit kein Einfluss von Ramipril 10 mg/d auf die Anzahl der zirkulierenden Progenitorzellen.

Angiotensin II verringert durch oxidativen Stress die Mobilisation der Progenitorzellen aus dem Knochenmark (*Imanishi 2005*). Folge ist eine sinkende Anzahl der zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen im peripheren Blut. Die Behandlung mit einem AT1-Rezeptorblocker oder einem Hemmstoff des Renin-Angiotensin-Systems (ACE-Hemmer) können diese negativen Effekte reduzieren (*Imanishi, Hanot und Nishio 2004, Min et al. 2004*). In aktuellen Studien konnte diese verminderte Mobilisation von EPC aus dem Knochenmark durch Induktion von oxidativem Stress bestätigt werden. Dieser Prozess wurde durch eine Behandlung mit Valsartan inhibiert (*Imanishi und Nishio 2005*). Der AT1 Rezeptor hat nicht nur eine bedeutende Rolle in der Genese der Atherosklerose, sondern auch in der Mobilisation und Funktion zirkulierender endothelialer Progenitorzellen. Angiotensin II vermittelte Stimulation am AT1 Rezeptor führt zu einer erhöhten Sauerstoffradikalfreisetzung durch Aktivitätserhöhung der NADPH-Oxidase. Der AT1 Rezeptor hat somit eine zentrale Rolle in der Entstehung und Progression der Atherosklerose (*Nickenig et al., Griendling et al. 1994*). Der resultierende vaskuläre Stress führt zu einem Fortschreiten der endothelialen Dysfunktion und zu einem progressiven Verlust von Endothelzellen (*Libby 2002*). AT1 Rezeptorantagonisten



haben gezeigt, dass sie eine antioxidative und vasoprotektorische Funktion, in Zusammenhang mit einer Downregulation der NADPH Oxidase-Expression bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit haben (*Rueckschloss et al. 2002*). Die Hemmung von Angiotensin II führt in Tierexperimenten zu vaskulären, kardialen und renalen Effekten unabhängig von der Blutdrucksenkung. Diese und weitere molekulare Mechanismen können für das Benefit bei Patienten mit Hypertension oder diabetischer Nephropathie eine Rolle spielen. Angiotensin-Converting-Enzym-Inhibitoren und Calciumkanalblocker zeigen diese Effekte auch, die Studienlage hierzu ist aber weniger gesichert (*De Champlain 2005*). Auch bei uns zeigt sich unter Telmisartan 80 mg/d bei 3 monatiger Gabe eine Verbesserung der endothelabhängigen Vasodilatation (+11%). Eine Verbesserung der Endothelfunktion durch den ACE Hemmer Ramipril, wie beschrieben von Min et al., konnte in unserem kleinen Kollektiv nicht festgestellt werden (*Min et al. 2004*). Ramipril führte zu keiner Erhöhung der Anzahl der EPC und nur zu einer dem Placeboeffekt entsprechenden Steigerung der reaktiv, hyperämischen Vasodilatation (Ramipril +3%, Placebo +2,7%).

In der kürzlich veröffentlichten EPCAD-Studie konnte in einer Subgruppe gezeigt werden, dass die colony forming units als replikative Potenz der zirkulierenden Vorläuferzellen in Korrelation mit der kardiovaskulären Ereignisrate stehen (*Werner et al. 2005*). In unserem Patientenkollektiv konnte keine Zunahme der CFU, weder bei Behandlung mit Telmisartan, noch bei Placebo gezeigt werden. Der ACE-Hemmer Ramipril senkte hingegen signifikant die replikative Potenz der Zellen. Eine mögliche Erklärung der unterschiedlichen Wirkung von AT1-Blockern und ACE-Hemmern könnte die Blockierung der lokalen, organbezogenen Synthesemöglichkeiten z.B. über Chymasen von Angiotensin II sein, welche durch AT1-Blocker, nicht aber durch ACE-Hemmer, inhibierbar sind.

### **5.2.1 Klinische Bedeutung der Studie**

In dieser Pilotstudie an Patienten mit stabiler koronarer Herzkrankheit führte die Einnahme des AT1-Antagonisten Telmisartan zusätzlich zur Standardmedikation zu einer Hochregulation der zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen und einer Verbesserung der Endothelfunktion. Dieser Effekt war nach Behandlung mit dem ACE-Hemmer Ramipril oder Placebo nicht zu beobachten. Die Aussagekraft der Untersuchung ist durch die kleine Fallzahl limitiert. Die Befunde weisen jedoch auf die prinzipielle Möglichkeit einer differentiellen Regulation der endothelialen Progenitorzellen durch unterschiedliche Inhibitoren des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems hin. Daher sind Studien an größeren Patientenkollektiven notwendig und sinnvoll.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Altmann SW, Davis HR Jr, Zhu LJ, Yao X, Hoss LM, Tetzloff G, Iver SP, Maguire M, Golovko A, Zeng M, Wang L, Murgolo N, Graziano MP. Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science* 2004;303:1201-1204
2. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor cells for angiogenesis. *Science* 1997;275:964-96
3. Basha BJ. Atherosclerosis: an update. *Am Heart J* 1996;131:1192-1202
4. Bishop AL, Hall A. Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* 2000 Jun 1;348(Pt 2): 241-255.348:241-255
5. Blann AD, Lip GYH, The endothelium in atherothrombotic disease: assessment of function, mechanisms and clinical implications. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1998;9: 297-306
6. Bokoch GM, Diebold BA. Current molecular models for NADPH oxidase regulation by Ryc GTPase. *Blood*. 2002;100:2692-2696
7. Brenner BM, Cooper ME, Zeeuw DD et al. Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *N Engl J Med*. 2001;345:861-869
8. Buchwald H, Boen JR, Nguyen PA, Williams SE, Matts JP. Plasma lipids and cardiovascular risk: a POSCH report. Program on the Surgical Control of the Hyperlipidemias. *Atherosclerosis*. 2001, 154:221-227
9. Cai H, Harrison DG, Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 2000;87: 840-844

10. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmermann GA, McEver RP. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 1998;91: 3527-3561
11. CONSENSUS Trial Study Group. Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure. Results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS). *N Engl J Med* 1987;316:1429-1435
12. De Champlain J. Do angiotensin II antagonists provide benefits beyond blood pressure reduction? *Adv Ther.* 2005;22:117-136
13. Deedwania PC. Clinical perspectives on primary and secondary prevention of atherosclerosis. *Med Clin North Am* 1995;79:973-998
14. Dujovne CA, Ettinger MP, McNeer JF, Lipka LJ, LeBeaut AP, Suresh R, Yang B, Veltri EP. Efficacy and safety of a potent new selective cholesterol absorption inhibitor, ezetimibe, in patients with primary hypercholesterolemia. *Am J Cardiol.* 2002;90:1092-1097
15. Dimmeler S, Aicher A, Vasa M, et al. HMG-CoA reductase inhibitor increase endothelial progenitor cells via the PI 3/Akt pathways. *J Clin Invest* 2001;108:391-397
16. Fadini G, Coracina A, Baesso I, Agostini C, Tiengo A, Avogaro A, de Kreutzenberg. Peripheral blood CD34+KDR+ endothelial progenitor cells are determinants of subclinical atherosclerosis in a middle-aged general population. *Stroke* 2006, 37: 2277-82
17. Euroaspire I and II group. Clinical reality of coronary prevention guidelines: a comparison of EUROASPIRE I and II in nine countries. *Lancet* 2001;357:995–1001
18. Ferrario CM, Flack JM. Pathologic consequences of increased angiotensin II activity. *Cardiovasc Drugs Ther* 1996;10:511-518

19. Fichtelscherer S, Schmidt-Lucke C, Bojunga S, Rössig L, Heeschen C, Dimmeler S, Zeiher A. Differential effects of short-term lipid lowering with ezetimibe and statins on endothelial function in patients with CAD: clinical evidence for „pleiotropic“ functions of statin therapy. *European Heart Journal* 2006;27:1182-1190
20. Fletcher G. Physical inactivity as a risk factor for cardiovascular disease. *Am J Med* 1997;107:10-11
21. Forgione MA, Leopold JA, Loscalzo J. Roles of endothelial dysfunction in coronary artery disease. *Curr Opin Card* 2000;15: 409-415
22. Fox KM, European trial on reduction of cardiac events with Perindopril in stable coronary Arterv disease Investigators. *Lancet* 2002;362:782-788
23. Gagne C, Gaudet D, Bruckert E. Efficacy and safety of ezetimibe coadministered with atorvastatin or simvastatin in patients with homozygous familial hypercholesterolemia. *Circulation*. 2002; 105:2469-2475
24. Gimbrone M. Vascular endothelium: An integrator of pathophysiologic stimuli in atherosclerosis. *Am J Cardiol* 1995;75: 67B-70B
25. Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*. 1990;343:425-430
26. Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW (1994) Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ.Res.* 1994;74:1141-1148
27. Grundy SM. Atherogenic dyslipidemia: lipoprotein abnormalities and implications for therapy. *Am J Cardiol* 1995;75:45-52
28. Harrison D, Griendling KK, Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Role of oxidative stress in atherosclerosis. *Am J Cardiol*. 2003;91:7A-11A

29. Heart Protection Study Group. MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20, 536 high-risk individuals: a randomised placebocontrolled trial. *Lancet* 2002; 360:7-22
30. Hill JM, Zalos G, Halxoc J, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T. Circulating Endothelial Progenitor Cells, Vascular Function, and Cardiovascular Risk, *N Engl J Med* 2003;348:593-600
31. Heitzer T, Yla-Herttuala S, Luoma J, Kurz S, Munzel T, Just H, Olschewski M, Drexler H. Cigarette smoking potentiates endothelial dysfunction of forearm resistance vessels in patients with hypercholesterolemia. *Circulation* 1996;93: 1346-1353
32. Iwai N, Shimoike H, Kinoshita M: Cardiac RAS in the hypertrophied heart. *Circulation* 1995; 92: 2690-2696
33. Imanishi T, Hano T, Nishio I. Angiotensin II potentiates vascular endothelial growth factor induced proliferation and network formation of endothelial progenitor cells. *Hypertens Res.* 2004;27:101-108
34. Imanishi T, Hano T, Nishio I. Angiotensin II accelerates endothelial progenitor cell senescence through induction of oxidative stress. *J Hypertens.* 2005;23:97-104
35. Keidar S. Angiotensin, LDL peroxidation and atherosclerosis. *Life Sci* 1998;63:1-11
36. Knopp RH, Gitter H, Truitt T, Bays H, Manion CV, Lipka LJ, LeBeaut AP, Suresh R, Yang B, Veltri EP. Effects of ezetimibe, a new cholesterol absorption inhibitor, on plasma lipids in patients with primary hypercholesterolemia. *Eur Heart J.* 2003;24:729-741
37. Landmesser U, Bahlmann F, Mueller M, Spiekermann S, Kirchhoff N, Schulz S, Manes C, Fischer D, de Groot K, Fliser D, Fauler G, März W, Drexler H. Simvastatin versus Ezetimibe. Pleiotropic and Lipid-Lowering Effects on Endothelial Function in Humans. *Circulation.* 2005;111:2356-2363

38. Lerner DJ, Kannel WB. Patterns of coronary heart disease morbidity and mortality in the sexes: a 26-year follow-up of the Framingham population. *Am Heart J* 1996;111:383-390
39. Liao JK, Laufs U. Pleiotropic Effects of Statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2004, in press
40. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002;420:868-874
41. Loscalzo J. Nitric Oxide insufficiency, platelet activation and arterial thrombosis. *Circ Res* 2001;88: 756-764
42. Laufs U, Liao JK. Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase. *J Biol Chem*. 1998;273:24266-24271
43. Laufs U, Wassmann S, Schackmann S, Heeschen C, Böhm M, Nickenig G. Beneficial effects of statins in patients with non-ischemic heart failure. *Z Kardiol*. 2004;93:103-108
44. Laufs U, Wassmann S, Fritz M, Sudhop T, Bergmann K, Böhm M, Nickenig G. Differential effect of atorvastatin and ezetimibe on Rac1 GTPase, oxidative stress and endothelial function, in press 2004
45. Laufs U, Werner N, Link A, Endres M, Wassmann S, Jürgens M, Mische E, Böhm M, Nickenig G. Physical Training Increases Endothelial Progenitor Cells, Inhibits Neointima Formation, and Enhances Angiogenesis. *Circulation* 2002;109:220-226
46. Lithell H. Pathogenesis and prevalence of atherosclerosis in hypertensive patients. *Am J Hypertens*;7:6
47. Llevadot J, Murasawa S, Kureishi Y, et al. HMG-CoA reductase inhibitor mobilizes bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *J Clin Invest* 2001;108:399-405

48. Lucius R, Gallinat S, Busche S, Rosenstiel P, Unger T. Beyond blood pressure: new roles for angiotensin II. *Cell Mol Life Sci* 1999;56:1008-1019
49. Maak C, Kartes T, Kilter H, Schäfers HJ, Nickenig G, Böhm M, Laufs U. Oxygen Free Release in Human Failing Myocardium is Associated with Increased Activity of Rac1-GTPase and Represents a Target for Statin Treatment. *Circulation*. 2003;108:1567-1574
50. Min TQ, Zhu CJ, Xiang WX, Hui ZJ, Peng SY. Improvement in endothelial progenitor cells from peripheral blood by ramipril therapy in patients with stable coronary artery disease. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2004;18:203-209
51. Mombouli JV, Vanhoutte PM . Endothelial dysfunction: From physiology to therapy. *J Mol Cell Cardiol* 1999;31: 61-74
52. National Cholesterol Education Programm Expert Pannel. Third Report of the National Cholesterol Education Programm (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Pannel III). National Heart, Lung, and Blood Institute, National Institutes of Health, Publication No 02-5215. 2002, 3143-3421
53. Nickenig G, Harrison DG .The AT(1)-type angiotensin receptor in oxidative stress and atherogenesis: part I: oxidative stress and atherogenesis. *Circulation* 2002 Jan 29;105:393-396
54. Nickenig G, Harrison, DG .The AT(1)-type angiotensin receptor in oxidative stress and atherogenesis: Part II: AT(1) receptor regulation. *Circulation* 2002;105:530-536
55. Nickenig G, Murphy TJ. Enhanced AT1 receptor mRNA degradation and induction of polyribosomal mRNA binding proteins by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol*. 1996;50:743-751
56. Roos R. Atherosclerosis - An inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:114-126



57. Rosenszweig A. Endothelial Progenitor Cells. *NEJM* 2003;348:581-582
58. Rueckschloss U, Quinn MT, Hotz J, Morawietz H. Dose dependent regulation of NADPH oxidase expression by angiotensin II in human endothelial cells. Protective effect of angiotensin II type receptor blockade in patients with coronary disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:1845-1851
59. Schmidt-Lucke C, Rossig L, Fichtlscherer S, Vasa M, Britten M, Kamper U, Dimmeler S, Zeiher AM, Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events. *Circulation* 2005; 111: 2981-2987
60. Schunkert H, Jackson B, Tang SS, Schoen FJ, Smits JFM, Apstein CS, Lorell BH: Distribution and functional significance of cardiac ACE in hypertrophied hearts. *Circulation* 1993; 87: 1328-39
61. Sever PS, Dahlof B, Poulter NR, Wedel H, Beevers G, Caulfield M, Collins R, Kjeldsen SE, Kristinsson A, McInnes GT, Mehlsen J, Nieminen M, O'Brian E, Ostergren J. Prevention of coronary and stroke events with atorvastatin in hypertensive patients who have average or lower-than-average cholesterol concentrations, in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial-Lipid Lowering Arm (ASCOT-LLA): a multicentre randomised controlled trial. *Lancet* 2003; 361:1149-1158
62. Sorescu D, Szocs K, Griendling KK. NADPH oxidases and their relevance to atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Me.* 2001;11:124-131
63. Steinberg HO, Bayazeed B, Hook G, Johnson A, Cronin J, Baron AD. Endothelial dysfunction is associated with cholesterol levels in the high normal range in humans. *Circulation* 1997;96: 3287-3293
64. Sudhop T, Lutjohann D, Kodal A, Igel M, Tribbel DL, Shah S, Perevozskaya I, von Bergmann K. Inhibition of intestinal cholesterol absorption by ezetimibe in humans. *Circulation.* 2002;106:1943-1948

65. Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res.* 2001;89:E1-7
66. Vasa M, Fichtlscherer S, Adler K, et al. Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. *Circulation* 2001; 103:2885-2890
67. Villareal FJ, Kim NN, Ungab Gu, Printz MP, Dillmann WH, Identification of functional angiotensin II receptors on rat cardiac fibroblasts. *Circulation* 1993; 88: 2849-2861
68. Wagner AH, Kohler T, Ruckschloss U, Just I, Hecker M. Improvement of Nitric Oxide-Dependent Vasodilation by HMG-CoA Reduktase Inhibitors Trough Attenuation of Endothelial Superoxide Anion Formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:61-69
69. Wassmann S, Laufs U, Baumer AT, Muller K, Konkol C, Sauer H, Böhm M, Nickenig G. Inhibition of Geranygeranylation Reduces Angiotensin II-Mediated Free Radical Procuction in Vascular Smooth Muscle Cells: Involvement of Angiotensin AT1 Receptor Expression and Rac1 GTPase. *Mol Pharmacol.* 2001;59:646-654
70. Wassmann S, Faul A, Hennen B, Scheller B, Böhm M, Nickenig G. Rapid effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibiton on coronary endothelial function. *Circ Res.* 2003;93:98-103
71. Wassmann S, Czech T, van Eickels M, Fleming I, Böhm M, Nickenig G. Inhibition of diet-induced atherosclerosis and endothelial dysfunction in apolipoprotein E/angiotensin II type 1A receptor doubleknockout mice. *Circulation* 2005. 2004;110:3062-3067
72. Werner N, Nickenig G. Clinical and therapeutical implications of EPC biology in atherosclerosis. *J Cell Mol Med* 20006;10:318-332

73. Werner N, Kosiol S, Schiegel T, Ahlers P, Walenta K, Link A, Böhm M, Nickenig G. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med*. 2005;353;999-1007
74. White CW. Benefit of aggressive lipid-lowering therapy: insights from the post coronary artery bypass graft study and other trials. *Am J Med* 1998;105:68-68
75. Williams JK, Anthony MS, Honore EK, Herrington DM, Morgan TM, Register TC, Clarkson TB. Regression of atherosclerosis in female monkeys. *Thromb Vasc Biol* 1995;15:827-836
76. Wilson PW. Metabolic risk factors for coronary heart disease: current and future prospects. *Curr Opin Cardiol* 1999;14:176-185
77. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Dans T, Avezum A, Lanas F, McQueen M, Budaj A, Pais P, Varigos J, Lisheng L. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (The INTERHEART study): case-control study. *Lancet*. 2004;364:937-952
78. Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R, Dagenais G. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 2000;342:145-153

## 7. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Ulrich Laufs, der mir durch seine engagierte und intensive Betreuung sowie seiner stetigen Hilfestellung, die hier vorgelegte Arbeit ermöglicht hat.

Herrn Professor Dr. med. M. Böhm gilt mein Dank für die Möglichkeit, die vorgelegten Experimente in den Forschungslaboren der Klinik III für Innere Medizin der Universität des Saarlandes in Homburg/Saar durchführen zu können.

Herrn Professor Dr. med. G. Nickenig und Herrn Professor Dr. med. Ulrich Laufs bin ich für die Überlassung der Themen, die wissenschaftliche Betreuung und Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit zu großem Dank verpflichtet.

Frau Isabel Paez-Mallez und Frau Simone Jäger gilt mein besonderer Dank für ihre Hilfsbereitschaft und kompetente Unterstützung.

Weiterhin gilt mein Dank allen Doktoranden und medizinisch technischen Assistentinnen des Labors für die große Hilfsbereitschaft und Kollegialität.

Mein Dank gilt auch meiner Familie und allen mir Nahestehenden für ihre mentale Unterstützung und Geduld.

## **8. Lebenslauf**

### **Profil**

Geboren am 12.01.76 in Neunkirchen/Saar  
Derzeit Assistenzarzt in der Gefäß- und Visceralchirurgie  
am Knappschafts Krankenhaus Püttlingen

### **WERDEGANG**

Grundschule Wellesweiler — 1982-1986

Realschule Neunkirchen — 1987-1992

Abschluss 1992 mit Mittlerer Reife

Höhere Handelsschule Neunkirchen — 1992-1994

Abschluss 1994 mit Fachabitur

Wirtschaftsgymnasium Saarbrücken — 1997-2000

Abschluss 2000 mit allgemeiner Hochschulreife

### **BERUFLICHER WERDEGANG**

Zivildienst — 1995-1996

Pflegediensthelfer — 1996

Krankenpflegeausbildung — 1996-1997

Beginn einer Ausbildung zur Krankenpflege am Universitätsklinikum Freiburg

Studentische Hilfskraft am Institut für

Epidemiologie und medizinische Statistik — 2000-2006

Studentische Hilfskraft am Institut für Physiologie — 2004-2005

Assistenzarzt in der Gefäß- und Visceralchirurgie  
am Knappschafts Krankenhaus Püttlingen — seit Oktober 2007

## **STUDIUM**

Ausbildung im Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes und an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

Beginn — Herbst 2000

Physikum — Herbst 2002

1.Staatsexamen — Herbst 2003

2.Staatsexamen — Frühjahr 2006

3.Staatsexamen — Frühjahr 2007

Promotion an der kardiologischen Klinik der Innern Medizin III, Universitätsklinik  
Homburg/Saar



